

---

# Charakterisierung der Ebf-Faktoren Ebf3 und Ebf4 *in vivo* und *in vitro*

Bettina Groll

---

DISSERTATION  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München



München 2011



---

# Charakterisierung der Ebf-Faktoren Ebf3 und Ebf4 *in vivo* und *in vitro*

**Bettina Groll**

---

DISSERTATION  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
**Bettina Groll**  
aus München

angefertigt am  
Helmholtz Zentrum für Gesundheit und Umwelt  
München

November 2011

Erstgutachter: PD Dr. Josef Mautner

Zweitgutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger

Tag der mündlichen Prüfung: 26. April 2012

Tag der Einreichung: 30. November 2011



*Damit das Mögliche entsteht, muss immer wieder das Unmögliche versucht werden.*

Hermann Hesse

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum München

Postfach, 81375 München

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft

Deutscher Forschungszentren (HGF)

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>IX</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
1.1 DIE EARLY B-CELL FAKTOREN .....	3
1.1.1 Ebf-Faktoren – Eine Klasse von HLH-Transkriptionsfaktoren mit hoher evolutionärer Konservierung.....	3
1.1.2 Die Faktoren der Ebf-Familie – essentiell in diversen Entwicklungsprozessen .....	5
1.1.3 Ebf1 – Der B-Zell-Regulator.....	8
1.1.4 Ebf2 – Wichtig zum Erhalt hämatopoetischer Stammzellen .....	10
1.1.5 Ebf3 – Die Deletion führt zu neonataler Letalität .....	11
1.1.6 Ebf4 – Ein Transkriptionsfaktor bisher unbekannter Funktion.....	12
1.2 DIE ENTWICKLUNG DER QUERGESTREIFTEN MUSKULATUR .....	13
1.2.1 Mesenchymale Stammzellen – Die Grundlage der Muskeln .....	13
1.2.2 Von der mesenchymalen Stammzelle bis zur Muskelfaser.....	13
1.2.3 Das Diaphragma.....	16
1.2.4 Die Rolle von Serca1.....	16
1.2.5 Ebf3 – Spielt der Transkriptionsfaktor eine Rolle in der Entwicklung des Diaphragmas?.....	18
1.3 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT.....	21
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
2.1 MATERIAL.....	22
2.1.1 Ausstattung.....	22
2.1.2 Verbrauchsmaterial .....	23
2.1.3 Enzyme, Reagenzien .....	24
2.1.4 Western-Blot-Antikörper .....	25
2.1.5 Reagenzien der Zellkultur .....	26
2.1.6 Längenstandards.....	27

2.1.7 Kits .....	27
2.1.8 Plasmide .....	28
2.1.8.1 Plasmide eingesetzt in Reporter Assays .....	28
2.1.8.2 Plasmide der ES-Zellkultur .....	29
2.1.8.3 Plasmide verwendet für <i>in situ</i> Hybridisierungen .....	30
2.1.8.4 Sonstige Plasmide .....	30
2.1.9 Sonden für Southern Blot-Analysen .....	31
2.1.10 Oligonukleotide .....	31
2.1.10.1 Oligonukleotide zur quantitativen Real-Time PCR-Analyse .....	31
2.1.10.2 Oligonukleotide für Klonierungen .....	33
2.1.10.3 Oligonukleotide zur Maus-Genotypisierung .....	35
2.1.10.4 Oligonukleotide zur punktgerichteten Mutagenese des <i>Atp2a1</i> -Promotors... 36	
2.1.10.5 Oligonukleotide zur Gelretardierung .....	37
2.1.10.6 Oligonukleotide für sonstige PCRs .....	38
2.1.11 Bakterien .....	38
2.1.12 Zelllinien .....	38
2.1.13 Mausstämme .....	40
2.1.14 Puffer und Lösungen .....	41
2.1.15 Software .....	42
2.2 METHODEN .....	44
2.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	44
2.2.1.1 Arbeiten mit RNA .....	44
2.2.1.1.1 RNA-Isolierung aus Säugerzellen .....	44
2.2.1.1.2 Herstellung von cDNA mittels RT-PCR .....	45
2.2.1.1.3 Quantitative Real-Time-PCR .....	45
2.2.1.2 Arbeiten mit DNA .....	46
2.2.1.2.1 DNA Präparation .....	46
2.2.1.2.1.1 Isolation von Plasmiden aus Bakterien .....	46
2.2.1.2.1.2 Isolation genomischer DNA aus Mausschwanzzellen .....	47
2.2.1.2.1.3 Isolation genomischer ES-Zell-DNA im 96-Loch-Format .....	47
2.2.1.2.1.4 Isolation genomischer ES-Zell-DNA im 10 cm Platten-Format .....	47
2.2.1.2.2 DNA Fällung und Reinigung .....	47
2.2.1.2.2.1 Phenol Extraktion .....	47
2.2.1.2.2.2 Ethanol Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen... 48	

2.2.1.2.2.3 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen .....	48
2.2.1.2.2.4 Punktgerichtete Mutagenese .....	48
2.2.1.2.3 Techniken der DNA-Analyse.....	49
2.2.1.2.3.1 Fragmentierung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	49
2.2.1.2.3.2 Enzymatische Fragmentierung genomischer DNA aus ES-Zellen ....	49
2.2.1.2.3.3 Southern-Blot .....	49
2.2.1.2.3.4 Markierung der Sonde .....	50
2.2.1.2.3.5 Hybridisierung der Southern-Blot-Membran .....	50
2.2.1.2.3.6 Entfernen der Sonde .....	51
2.2.1.2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	51
2.2.1.2.3.8 <i>Longrange</i> -PCR .....	52
2.2.1.3 Arbeiten mit Proteinen .....	52
2.2.1.3.1 Proteinextraktion aus Säugerzellen für Western-Blot-Analysen .....	52
2.2.1.3.2 Proteinextraktion für Luziferase-Reporter-Assays.....	53
2.2.1.3.3 Proteinextraktion von Kernproteinen für Gelretardierung .....	53
2.2.1.3.4 <i>In vitro</i> Translation von Proteinen .....	54
2.2.1.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Reagenz.....	54
2.2.1.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen .....	54
2.2.1.3.7 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen.....	55
2.2.1.3.8 Immundetektion von Proteinen .....	55
2.2.1.3.9 Entfernen der Antikörper .....	56
2.2.1.3.10 Coomassie-Färbung.....	56
2.2.1.4 Arbeiten mit <i>E. coli</i> Bakterien.....	56
2.2.1.4.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien .....	56
2.2.1.4.2 Transformation von <i>E. coli</i> Bakterien .....	57
2.2.2 Biochemische Methoden .....	57
2.2.2.1 Luziferase- und $\beta$ -Galaktosidase-Test.....	57
2.2.2.1.1 Luziferase-Messung .....	57
2.2.2.1.2 $\beta$ -Galaktosidase-Messung .....	58
2.2.2.2 Gelretardierung.....	58
2.2.2.2.1 Oligonukleotid-Annealing.....	58
2.2.2.2.2 Radioaktive Markierung der Oligonukleotide.....	58
2.2.2.2.3 Bindereaktion von Proteinen an radioaktiv markierte Oligonukleotide....	59

2.2.2.2.4 EMSA ( <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> ).....	59
2.2.2.3 Histologische Analysen.....	59
2.2.2.3.1 Vorbereitung des Gewebes.....	59
2.2.2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	60
2.2.2.4 <i>In situ</i> Hybridisierung.....	60
2.2.2.4.1 Sondenherstellung.....	60
2.2.2.4.2 <i>In situ</i> Hybridisierung und Nissl-Färbung.....	61
2.2.3 Zellkulturtechniken .....	63
2.2.3.1 Kultivierung der Zellen .....	63
2.2.3.1.1 Allgemeine Zellkultur-Techniken.....	63
2.2.3.1.2 Ablösen von adhärennten Zellen.....	64
2.2.3.1.3 Bestimmung der Zelldichte .....	65
2.2.3.1.4 Kryokonservierung von Zellen.....	65
2.2.3.1.5 Kultivierung und Differenzierung von primären Osteoblasten.....	65
2.2.3.1.6 <i>In vitro</i> Differenzierung von C2C12-Zellen.....	66
2.2.3.1.7 Kultivierung von embryonalen Fibroblastenzellen.....	66
2.2.3.1.8 Mitotische Inaktivierung von embryonalen Fibroblastenzellen.....	66
2.2.3.1.9 Kultivierung von embryonalen Stammzellen.....	66
2.2.3.2 Generierung stabiler ES-Zell-Klone.....	67
2.2.3.2.1 Transfektion .....	67
2.2.3.2.2 Selektion.....	67
2.2.3.2.3 Vereinzeln und Expandieren .....	67
2.2.3.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen.....	68
2.2.3.3.1 Transfektion von HEK293T-Zellen mittels Polyethylenimin.....	68
2.2.3.3.2 Transfektion von adhärennten Zellen mit Lipofectamin.....	69
2.2.3.3.3 Transfektion von Ba/F3-Zellen .....	69
2.2.3.4 Isolation von murinen Zellen .....	69
2.2.3.4.1 Isolation embryonaler Fibroblastenzellen .....	69
2.2.3.4.2 Isolation primärer embryonaler Knochenzellen.....	70
2.2.3.4.3 Isolation muriner Zellen aus Knochenmark, Diaphragma, Milz und Thymus.....	70
2.2.4 Durchflusszytometrie .....	71
2.2.4.1 Analyse.....	71
2.2.4.2 Sortierung von Zellen.....	73

2.2.5 Arbeiten mit Mäusen .....	74
2.2.5.1 Isolation von Embryonen .....	74
2.2.5.2 Isolation des Diaphragmas für immunhistologische Untersuchungen .....	74
2.2.5.3 De-Hydrierung und Paraffineinbettung von Embryonen .....	74
2.2.6 Statistik und Kalkulationen .....	75
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>76</b>
3.1 <i>ATP2A1</i> IST EIN ZIELGEN VON EBF3 .....	76
3.1.1 <i>Ebf3</i> ist in Muskelgeweben exprimiert.....	76
3.1.2 Die Expression von <i>Atp2a1</i> in Muskelzellen ist von der Expression von <i>Ebf3</i> abhängig .....	78
3.1.3 Die Deletion von <i>Ebf3</i> reduziert die Expression von wichtigen Muskel-Genen in vivo.....	83
3.1.4 <i>Ebf3</i> induziert die Expression von essentiellen Genen der Muskelentwicklung in vitro .....	84
3.2 BIOCHEMISCHE AKTIVITÄTEN VON EBF3 UND EBF4 .....	87
3.2.1 Die transaktivierende Funktion von <i>Ebf3</i> und <i>Ebf4</i> .....	87
3.2.2 <i>Ebf4</i> kann in der Transaktivierung sowohl eine hemmende als auch eine aktivierende Rolle einnehmen .....	89
3.3 DIE BIOLOGISCHE ROLLE VON EBF3 UND EBF4 .....	92
3.3.1 <i>Ebf3</i> und <i>Ebf4</i> werden in frühen Stadien der Embryonalentwicklung exprimiert ..	92
3.3.2 Alle <i>Ebf</i> -Faktoren besitzen ein komplexes Expressionsmuster .....	94
3.3.3 <i>Ebf3</i> und <i>Ebf4</i> sind nicht in hämatopoetischen Zellen exprimiert .....	96
3.4 ENTWICKLUNG EINES KONDITIONALEN DELETIONS-MODELS FÜR <i>EBF4</i> .....	100
3.4.1 <i>Ebf4</i> ist in neuronalen Geweben exprimiert.....	100
3.4.2 Das Zink-Finger-Motiv der DNA-Binde-Domäne als potentiell Ziel einer konditionalen Deletion .....	102
3.4.3 ES-Zell-Analyse .....	105
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>108</b>
4.1 DIE ROLLE VON EBF3 IN DER ENTWICKLUNG VON MUSKELZELLEN DES DIAPHRAGMAS .....	108
4.2 IST EBF3 DER BISHER UNBEKANNTE GRUND DER BRODY-ERKRANKUNG? .....	111
4.3 EBF4 – EIN ATYPISCHES FAMILIENMITGLIED DER EBF-FAMILIE? .....	113
4.4 OPTIMIERUNG DER DELETIONS-STRATEGIE FÜR <i>EBF4</i> .....	115

<b>REFERENZEN.....</b>	<b>119</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>138</b>
<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>140</b>
<b>VERÖFFENTLICHUNGEN.....</b>	<b>141</b>
<b>EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>142</b>
<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>142</b>

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
Tab. 1.1 Übersicht der Ebf-Familienmitglieder. ....	7
Abb. 1.1 Die Ebf ( <i>Early B-cell factor</i> )-Familienmitglieder sind sowohl untereinander als auch evolutionär hoch konserviert. ....	3
Abb. 1.2 Ebf1 ist ein essentieller Faktor der B-Zell-Entwicklung.....	8
Abb. 1.3 Ebf2 ist wichtig zum Erhalt hämatopoetischer Stammzellen.....	11
Abb. 1.4 Die Muskelentwicklung von mesodermalen Vorläufer-Zellen bis hin zur Muskelfaser. ....	15
Abb. 1.5 Die Deletion von <i>Ebf3</i> ist neonatal letal und ähnlich dem Phänotyp der Deletion von <i>Atp2a1</i> . ....	19
<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>76</b>
Abb. 3. 1 <i>Ebf3</i> ist im Embryo vor allem in Muskelgeweben, Knochenmark und Gehirn exprimiert. ....	77
Abb. 3. 2 Ebf3 reguliert die Expression von <i>Atp2a1</i> im embryonalen Diaphragma.....	79
Abb. 3. 3 Ebf3 ist in der Lage, an den <i>Atp2a1</i> -Promotor zu binden und ihn zu transaktivieren. ....	81
Abb. 3. 4 Ebf3 kann die Expression wichtiger Faktoren der Muskelzelldifferenzierung negativ beeinflussen. ....	83
Abb. 3. 5 Ebf3 induziert die Expression von <i>Atp2a1</i> und MRF-Genen.....	85
Abb. 3. 6 Alle Ebf-Familienmitglieder können den <i>Atp2a1</i> -Promotor transaktivieren. ....	87
Abb. 3. 7 Ebf4 ist ein negativer Regulator der Transaktivierung des <i>AcIII</i> -Promotors. ....	88
Abb. 3. 8 Ebf1, 2, 3 und 4 können B-Zell-spezifische Promotoren aktivieren. ....	90
Abb. 3. 9 Alle Ebf-Proteine sind in der Lage, den <i>Ang</i> -Promotor zu transaktivieren.....	91
Abb. 3. 10 <i>Ebf1</i> , <i>Ebf2</i> und <i>Ebf3</i> werden ab E8.5 bzw. E9.5 exprimiert, <i>Ebf4</i> ab E11.5 pc. ....	93
Abb. 3. 11 Die Ebf-Faktoren zeigen ein komplexes, individuelles Expressionsmuster. ....	95
Abb. 3. 12 <i>Ebf4</i> ist in den nicht-hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks exprimiert. ....	96
Abb. 3. 13 <i>Ebf3</i> und <i>Ebf4</i> sind vorrangig in unreifen Osteoblasten exprimiert. ....	97
Abb. 3. 14 <i>Ebf3</i> und <i>Ebf4</i> sind vorrangig in osteoblastären und adipozytären Zellen exprimiert. ....	99
Abb. 3. 15 <i>Ebf4</i> ist vor allem in neuralen Geweben exprimiert.....	101



Abb. 3. 16 Die Strategiefindung zur konditionalen Deletion von <i>Ebf4</i> .....	103
Abb. 3. 17 Manipulation und Selektion von ES-Zellen zur konditionalen Deletion von <i>Ebf4</i> .....	106
<b>DISKUSSION.....</b>	<b>108</b>
Abb. 4. 1 Mögliche Rollen von Ebf3 in der Muskelentwicklung des Diaphragmas.....	109
Abb. 4. 2 Möglichkeiten der Optimierung der <i>Ebf4</i> -Deletions-Strategie. ....	116

## ABKÜRZUNGEN

$\alpha$	<i>alpha</i> oder (im Zusammenhang mit Antikörpern) anti
A	Adenin
A-Bande	anisotroper Bereich des Sarkomers
Abb.	Abbildung
AcIII	Adenylyl cyclase 3
ad	auf das angegebene Gesamtvolumen auffüllen
Ang	Angiogenin
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
<i>Atp2a</i>	Gen kodierend für Serca-Proteine
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$	<i>beta</i>
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
$\beta$ -ME	2- $\beta$ -Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
$\text{Ca}^{2+}$	Kalzium
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNS)
Ci	Curie
CKO	<i>Conditional Knock Out</i> (konditionale Deletion)
Cl	Chlorid
CMV	Cytomegalovirus
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
Col	Collier
cpm	<i>counts per minute</i> (Anteil pro Minute)
Cre	<i>Causes recombination</i> , DNA Rekombinase des Bakteriophagen PI
Cu	Kupfer
Cy	Cyanin

Da	Dalton
DBD	DNA-Binde-Domäne
Del	Deletion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	DNS, Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribunucleic acid</i> )
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	steriles PBS
DTT	Dithiothreitol
E	Tag in der Embryonalentwicklung
Ebf	<i>Early B-cell</i> Faktor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	embryonale Fibroblasten
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ES	embryonale Stammzelle
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii / et aliae</i>
F	Farad
Fc	konstanter Teil der schweren Antikörper-Kette
FDG	Fluorescein-di- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
fl	<i>full length</i> (gesamte Länge)
flox	von zwei loxP-Sequenzen flankierte Sequenz
flt	<i>flippase recognition target</i> , Flp-Erkennungs-Sequenz
Flp	<i>Flippase</i>
FT	<i>Fast Twitch</i> (schnell zuckend)
fwd	<i>forward</i>
g	Gramm
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
Gfp	<i>Green flurescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)

ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
IRES	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i> (interne ribosomale Eintrittsstellen)
HCl	Hydrogenchlorid
HEPES	4 (2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix-Domäne
HMGU	Helmholtz Zentrum München – Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
H <sub>2</sub> O	Wasser, ausschließlich über Millipore-Anlage destilliert und autoklaviert
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
Hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HSC	hämatopoetische Stammzelle
I-Bande	isotroper Bereich
Ig	Immunglobulin
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierungs-Sonde
k	Kilo
K	Kalium
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Ko	<i>Knock out</i> (Deletion)
λ	Lambda
l	Liter
lacZ	Lactose-Operon Z
LB	Luria Bertani
LHA	linker Homologiearm
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
loxP	Locus des <i>crossover</i> (x) in PI
μ	mikro
m	milli
M	Molar
Mb-1	<i>Membrane bound 1</i>
MEMalpha	Minimum Essential Medium
Mg	Magnesium
min	Minute

<i>mock</i>	Leervektor als Kontrolle unspezifischer Effekte
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
MRF	<i>Myogenic Regulatory Factors</i>
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Boten-RNS)
MSC	mesenchymale Stammzelle
M-Scheibe	Mittel-Scheibe
MW	Molekulargewicht
Myf	<i>Myogenic factor</i>
MyoD	<i>Myogenic Determination factor</i>
MyoG	Myogenin
n	nano
n=	Anzahl der biologischen Replikate
Na	Natrium
NaOH	Natriumhydroxid
n.K.	Negativkontrolle
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren
NEB	New England Bioscience
Neo	Neomycin (G418)
NP40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
Olf	<i>Olfactory factor</i>
p	pico
p<	kalkulierter Signifikanzwert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pax	<i>Paired box</i>
Pbgd	Porphobilinogen Deaminase
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-Natriumchlorid Puffer)
PBST	<i>Phosphate Buffered Saline</i> mit 0,4 % Tween 20
pc	<i>post coital</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	R-Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein

PI	Propidium Iodid
PGK	Phosphoglyceratkinase
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Pr.	Promotor
OptiMEM	Modifikation des Eagle's Minimum Medium
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
rev	revers
RNA	RNS, Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RHA	rechter Homologiearm
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Medium entwickelt am Roswell Park Memorial Institut
RT	Reverse Transkription
sec	Sekunde
Serca	Sarko(endo)plasmatische Retikulum $\text{Ca}^{2+}$ ATPase
SDM	<i>Standard Deviation of the Mean</i> (Standardabweichung der Mittelwerte)
SDS	<i>Sodium-Dodecyl-Sulfate</i>
$\text{SO}_4$	Sulfat
SSC	<i>Saline-Sodium-Citrate</i>
ST	<i>Slow Twitch</i> (langsam zuckend)
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAD	Transaktivierungs-Domäne
TAE	Tri/Acetat/EDTA
TBE	<i>Tris Buffered</i> EDTA
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIG	<i>Transcription factor-Immunoglobulin-like</i> oder <i>Immunoglobulin-like-plexin-transcription factor (IPT)</i> -Domäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> (Einheiten)
Unc-3	<i>Uncoordinated-3</i>

## ABKÜRZUNGEN

---

UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
Wt	Wildtyp
Xcoe	<i>Xenopus collier-olfactory factor-ebf</i>
z.B.	zum Beispiel
Zcoe	<i>Zebrafisch collier-olfactory factor-ebf</i>
Z-Scheibe	Zwischen-Scheibe
+/+	2 Wildtyp-Allele
+/-	heterozygot, 1 Wt-, 1 Deletions-Allel
-/-	homozygot, 2 Deletions-Allele

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Familie der *Early B-cell* Faktoren gehört zu einer Klasse DNA-bindender Transkriptionsfaktoren mit einem essentiellen Zink-Finger-Motiv zur DNA-Bindung, einer Helix-Loop-Helix-Domäne zur Dimerisierung und einer Transaktivierungsdomäne. Seit ihrer Entdeckung 1991 konnten den Familienmitgliedern wichtige Rollen in diversen Entwicklungsprozessen zugesprochen werden. Aufgrund der hohen Homologie werden nicht nur spezifische, sondern auch redundante Funktionen der vier bisher in *Mus musculus* identifizierten Ebf-Proteine vermutet. Im Gegensatz zu Ebf1 und Ebf2 wurde die Funktion der anderen murinen Mitglieder, Ebf3 und Ebf4, bisher nur wenig beschrieben.

Die Deletion von *Ebf3* in *Mus musculus* führt dazu, dass die Tiere nach der Geburt zyanotisch werden, eine Schnappatmung aufweisen und nach kurzer Zeit sterben. Bisher ist jedoch nicht bekannt, was zu diesem Phänotyp führt. So könnte die Ursache in einer Dysfunktion von Lunge, Rippen oder Zwerchfell (Diaphragma) liegen. Für die orthologen Proteine Collier (*Drosophila melanogaster*), Xcoe2 und Xcoe3 (*Xenopus laevis*) konnte bereits eine Rolle in der Muskelentwicklung gezeigt werden. Damit übereinstimmend wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Expression von *Ebf3* unter anderem in muskulären Geweben wie dem Diaphragma demonstriert, was die beeinträchtigte Atmung der *Ebf3*-defizienten Tiere begründen könnte. So wurde *Atp2a1*, das für die Sarko(endo)plasmatische Retikulum-Kalzium-ATPase Serca1 kodiert, als potentiell Zielgen von Ebf3 identifiziert. Serca1 stellt als Kalzium-Pumpe einen wichtigen Bestandteil für die Funktion der Muskulatur dar. Weiterhin wurde *in vitro* sowie *in vivo* mittels Deletions- als auch Überexpressions-Studien demonstriert, dass Ebf3 direkt oder indirekt die Expression von Muskelgenen wie *Myf5* und *MyoD* induziert. Ebf3 könnte somit eine übergeordnete Rolle in der Muskelentwicklung spielen.

Der zweite im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Transkriptionsfaktor ist Ebf4. Die Expression des Faktors konnte ab dem embryonalen Tag E11.5 *post coital* vor allem in neuralen und mesenchymalen Geweben detektiert werden. Im adulten Tier ist *Ebf4* ähnlich zu den anderen Familienmitgliedern vor allem in Auge und Gehirn stark exprimiert. Funktionelle Analysen ergaben, dass Ebf4 entgegen der bisherigen Annahme kein universeller Negativ-Regulator der Transaktivierung der anderen Familienmitglieder ist. Dies scheint eher eine Promotor- bzw. Gewebe-abhängige Funktion zu sein. Weiterhin wird in dieser Arbeit eine konditionale Deletions-Strategie von *Ebf4* erarbeitet, bei welcher das Zink-Finger-Motiv der DNA-Binde-Domäne das Ziel der Deletion darstellt.



## ABSTRACT

The Ebf family encodes highly conserved helix-loop-helix-transcription factors with an essential zinc-finger-motif inside their DNA-binding domain and a transactivation domain. Since their discovery in *Mus musculus* in 1991 data on involvement in several developmental processes were published. Due to the fact that the proteins are highly conserved, redundant functions are assumed in addition to the specific roles of the family members. While Ebf1 and Ebf2 are relatively well characterised, less is known about the functions of Ebf3 and Ebf4 *in vivo*.

The deletion of *Ebf3* results in neonatal lethality with a cyanotic and gasping phenotype of the newborn mice. The reason could be a dysfunction of lung, costals or diaphragm. For the orthologous factors Collier (*Drosophila melanogaster*), Xcoe2 and Xcoe3 (*Xenopus laevis*) involvement in muscle development could be demonstrated. Consistently with these data *Ebf3* expression was detectable in adult muscular tissues like diaphragm, which could explain the impaired respiration. An essential factor for the function of the diaphragm, *Atp2a1*, encoding the Sarco(endo)plasmatic reticulum-calcium-ATPase1 Serca, was identified to be a potential target gene of Ebf3. Loss- and gain-of-function experiments *in vitro* and *in vivo* revealed an Ebf3-dependent expression of the muscle development factors *Myf5* and *MyoD*. Ebf3 could hence be essential for proper development of muscle, in particular the diaphragm.

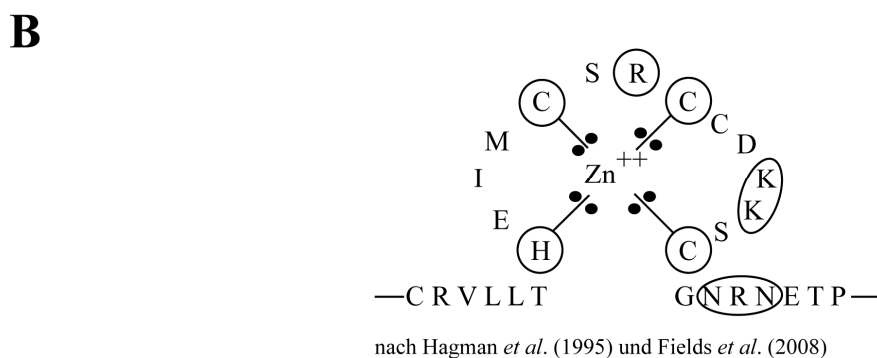
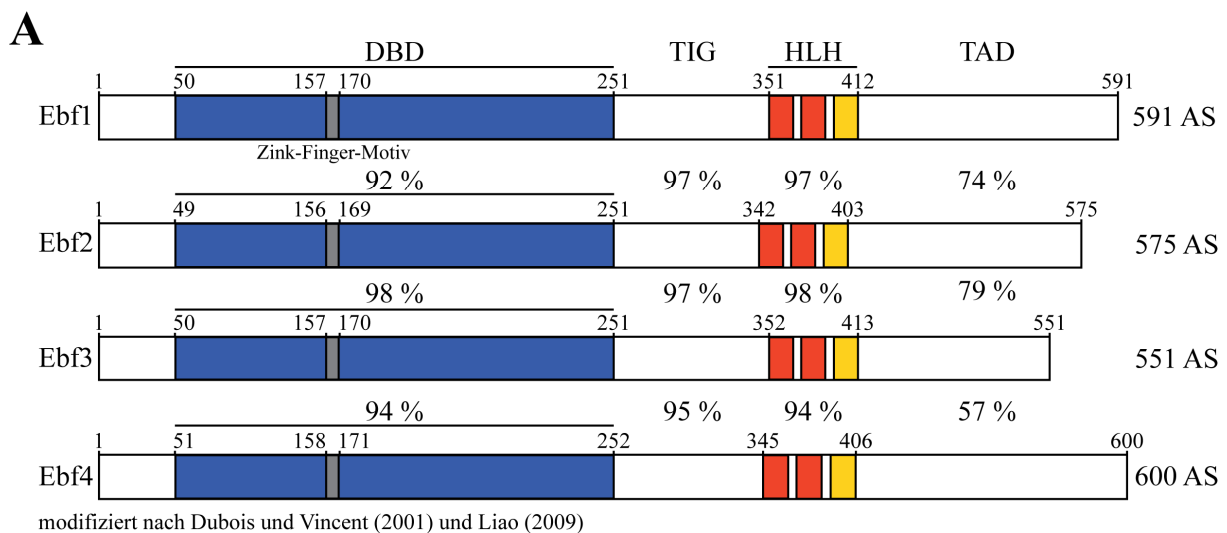
The second analysed transcription factor, *Ebf4* was found to be expressed from embryonic day E11.5 *post coital* on with a high expression in neural and mesenchymal tissues. Similar to the other Ebf factors strong expression could be detected in adult tissues like eye and brain. In contrast to previously published data functional analysis showed that Ebf4 acts not in general as a negative-regulator of the transactivation potential of other Ebf proteins, but can also enhance the transcription of Ebf target genes in a promoter- or tissue-dependent way. To gain more insight into the role of Ebf4 *in vivo*, a strategy for conditional deletion of the zinc finger motif located in the DNA-binding domain of *Ebf4* has been developed.

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Die *Early B-cell* Faktoren

### 1.1.1 Ebf-Faktoren – Eine Klasse von HLH-Transkriptionsfaktoren mit hoher evolutionärer Konservierung

Die Familie der *Early B-cell* Faktoren (Ebf, auch bekannt unter Olf, *olfactory factor*; O/E, *Olfactory factor/Ebf* oder COE, *Collier-Olfactory factor-Ebf*) gehört zu den DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren mit einer Helix-Loop-Helix-Domäne. Ähnlich zu anderen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren besitzen die Proteine der Ebf-Familie eine gut charakterisierte modulare Struktur mit vier funktionellen Domänen (Abb. 1.1A).



**Abb. 1.1 Die Ebf (*Early B-cell factor*)-Familienmitglieder sind sowohl untereinander als auch evolutionär hoch konserviert.**

(A) Die vier in den *Mammalia* derzeit nachgewiesenen Ebf-Faktoren besitzen eine Länge von 551 (Ebf3) bis zu 600 (Ebf4) Aminosäuren (AS). Hier gezeigt sind die murinen Ebf-Faktoren. Ihre Domänen (DBD, DNA-Binde-Domäne; TIG, *Transcription factor-Ig-like*; HLH, Helix-Loop-Helix-Domäne; TAD, Transaktivierungs-Domäne) sowie ihre Konservierung sind gekennzeichnet. (B) Schema des Zink-Finger-Motivs der DBD. Zentrale Aminosäuren zur Komplexbildung mit dem Zink-Ion wurden durch einen Kreis und Striche gekennzeichnet, während essentielle Aminosäuren der DNA-Bindung eingekreist wurden.

Die DNA-Binde-Domäne (DBD) nahe dem N-Terminus (NH<sub>2</sub>-Ende) ist in den murinen Familienmitgliedern bis zu 98 % konserviert und besteht aus ca. 200 Aminosäuren (Hagman *et al.*, 1993; 1995; Treiber *et al.*, 2010a). Mit Hilfe des atypischen Zink-Finger-Motivs (Abb. 1.1B) binden die Proteine als Homo- oder Heterodimere spezifisch an die palindromische Konsensussequenz 5'-ATT CCC NN GGG AAT-3' (Travis *et al.*, 1993; Hagman *et al.*, 1993; 1995; Wang und Reed, 1993; Treiber *et al.*, 2010a). Die Polypeptidkette der Ebf-Faktoren wird zur Bildung des Komplexes in einer schleifenförmigen Struktur um das zentrale Zink-Ion (Zn<sup>2+</sup>) gebunden; hierbei wichtig für die Stabilisierung des Komplexes mit dem Zink-Ion sind die in der Schleife befindlichen Aminosäuren (H-X<sub>3</sub>-C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>5</sub>-C). Für die Bindung an DNA und somit die transkriptionelle Aktivierung sind weitere zentrale Aminosäuren essentiell (Abb. 1.1B), was von Hagman *et al.* (1995) und Fields *et al.* (2008) gezeigt wurde und durch die Analyse der Kristallstruktur von Ebf1 bestätigt werden konnte (Siponen *et al.*, 2010; Treiber *et al.*, 2010a). Nach neuesten Erkenntnissen ist jedoch nicht nur allein das Zink-Finger-Motiv für die spezifische Bindung der Ebf-Faktoren an die DNA essentiell, sondern insgesamt drei Module: Zum einen, wie erwähnt, das Zink-Finger-Motiv, welches die palindromische Konsensussequenz in der kleinen DNA-Furche erkennt. Des Weiteren eine GH-Schleife, welche durch drei zentrale Aminosäuren (Asparagin197, Glycin203, Asparagin204) an konservierte Basen außerhalb des Erkennungsmotivs in der kleinen Furche bindet und Wasserstoffbrücken zu den Basen und dem DNA-Rückgrad bildet. Das dritte, sogenannte zentrale Modul, erkennt ebenso wie das Zink-Finger-Motiv das Palindrom und bindet daran in der großen DNA-Furche (Treiber *et al.*, 2010a). Nach der DBD folgt eine TIG-Domäne (*transcription factor-Immunglobulin-like* oder IPT-Domäne, *Immunglobulin-like-plexin-transcription factor*), deren Funktion bisher noch unbekannt ist. So konnte jedoch eine große Ähnlichkeit zur TIG-Domäne von Transkriptionsfaktoren wie z.B. NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*; Sen und Baltimore 1986) und NFAT (*nuclear factor of activated T cells*; McCaffrey *et al.*, 1993; Giffin *et al.*, 2003) entdeckt werden, was die Vermutung zulässt, dass diese Domäne auch an der Dimerisierung der Ebf-Faktoren beteiligt sein könnte (Bork *et al.*, 1999; Aravind und Koonin, 1999, Artigiani *et al.*, 1999; Liberg *et al.*, 2002; Treiber *et al.*, 2010a). Weiterhin besitzen die Faktoren der Säugetiere eine atypische Helix-Loop-Helix-Domäne (HLH) mit einer wiederholten Helix 2 zur Formation von Homo- und Heterodimeren. So sind die ersten beiden alpha-Helices (H1 und H2A) von ihrer Struktur ähnlich zu anderen HLH-Proteinen, wie Myc (*myelocytomatosis viral oncogene homolog*) und MyoD (*myogenic determination factor*), während die dritte alpha-Helix (H2B) mit ihrer großen Ähnlichkeit zur zweiten Helix vermutlich durch Exon-

Duplikation in den Vertebraten entstanden ist. (Vinson und Garcia, 1992; Hagman *et al.*, 1993; 1995; Liberg *et al.*, 2002; Daburon *et al.*, 2008; Treiber *et al.*, 2010a). Die transkriptionelle Aktivität der Proteine wird durch eine Transaktivierungsdomäne in der DBD (TAD1) und die COOH-terminale Serin-Threonin-Prolin-reiche Domäne (TAD2) vermittelt. Diese Domäne ist mit nur 57 % Konservierung im Falle von Ebf4 die unähnlichste Domäne der Familie (Hagman *et al.*, 1995).

### **1.1.2 Die Faktoren der Ebf-Familie – essentiell in diversen Entwicklungsprozessen**

Im Jahre 1991 bzw. 1992 (Hagman *et al.*; Feldhaus *et al.*) konnten zwei Arbeitsgruppen erstmalig ein Protein der Familie im Zusammenhang mit dem für die B-Zell-Entwicklung essentiellen *Mb-1*-Gen entdecken. Im Kontext von hämatopoetischen Zellen konnte Hagman *et al.* (1993) ein Protein (Ebf1) beschreiben, welches später als essentiell in der Entwicklung von B-Zellen identifiziert wurde (Lin und Grosschedl, 1995). Zeitgleich wurde von Wang *et al.* (1993) eine wichtige Funktion in neuronaler Entwicklung von olfaktorischem Gewebe (Olf-1) herausgestellt. In späteren Studien konnten neben dem namensgebenden Ebf1 auch Ebf2 (Malgaretti *et al.*, 1997), Ebf3 (Garel *et al.*, 1997) und Ebf4 (Wang *et al.*, 2002) als weitere murine Mitglieder der Familie identifiziert werden. Zudem wurde auch die evolutionäre Zugehörigkeit mit zwei Genen in *Xenopus laevis* (*Xcoe2* und *Xcoe3*, Dubois *et al.*, 1998; Pozzoli *et al.*, 2001), einem Gen in Zebrafisch (*Danio rerio*, *Zcoe2*; Bally-Cuif *et al.*, 1998), dem *Drosophila melanogaster*-Gen *Collier* (*Col*, Crozatier *et al.*, 1996) und *Unc-3*, dem Gen in *Caenorhabditis elegans* (*Uncoordinated-3*; Brenner, 1974) charakterisiert. Entwicklungsbiologisch gesehen wird vermutet, dass Ebf2 und Ebf4 aufgrund ihrer höheren Verwandtschaft zu den Invertebraten-Proteinen *Collier* und *Unc-3* die ersten Ebf-Proteine in Vertebraten waren, während Ebf1 und Ebf3 später durch Gen-Duplikationen entstanden sind (Liberg *et al.*, 2002).

In allen drei embryonalen Keimblättern detektierbar (Liberg *et al.*, 2002) sind die Familienmitglieder nicht nur in B-Zellen und neuronalen Zellen, sondern auch in anderen Zelltypen exprimiert und sind in diversen Entwicklungsprozesse involviert:

Spezies	Gen	ausgewählte Expressionen	ausgewählte Funktionen
Säugetiere	<i>Ebf1</i>	Lymphoide Vorläuferzellen <sup>1</sup> B-Zellen <sup>1</sup> Adipozyten <sup>2, 3</sup> Postmitotische Neuronen <sup>4</sup> Subventrikuläre Zone des lateralen Ganglienhöckers <sup>5</sup>	Entwicklung der B-Zellen <sup>1</sup>  Differenzierung von Adipozyten <sup>2</sup> Differenzierung von Neuronen und ihrer Migration <sup>4, 5</sup>
	<i>Ebf2</i>	Unreife Osteoblasten <sup>6</sup>  Adipozyten <sup>3</sup> Subventrikuläre Zone des Neuralrohrs <sup>5</sup>	Erhalt von hämatopoetischen Stammzellen <sup>6</sup>  Differenzierung von Adipozyten <sup>3</sup> Migration von Neuronen <sup>5</sup>
	<i>Ebf3</i>	Adipozyten <sup>3</sup> Postmitotische Neuronen <sup>5</sup>	Differenzierung von Adipozyten <sup>3</sup> Migration von Neuronen <sup>5</sup> Zellzyklus-Arrest und Apoptose <sup>7</sup>
	<i>Ebf4</i>	Retinale Zellen <sup>8</sup> Neuronen des olfaktorischen Epithels <sup>9</sup>	Spezifizierung retinaler Zellen <sup>8</sup>
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Col</i>	Embryonale Kopfregion <sup>10</sup> Muskuläre Vorläuferzellen <sup>11</sup> Flügelanlagen <sup>12</sup>	Formation eines Kopfsegments <sup>10</sup> Myoblast-Fusion (DA3) <sup>11</sup> Äderung der Flügel (L3-L4) <sup>12</sup>
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Unc-3</i>	Ventrale Motoneuronen <sup>13</sup> Chemosensorische Neuronen <sup>13</sup>	Orientierung der Motoneuronen <sup>13</sup> Entwicklung der Neuronen (ASI amphide Neuronen) <sup>13</sup>
<i>Danio rerio</i>	<i>Zcoe2</i>	Neuroblasten des zentralen Nervensystems <sup>14</sup>	Differenzierung der Neuronen <sup>14</sup>

<sup>1</sup> Lin und Grosschedl, 1995

<sup>2</sup> Hesslein *et al.*, 2009

<sup>3</sup> Akerblad *et al.*, 2002; Jimenez *et al.*, 2007

<sup>4</sup> Garel *et al.*, 1999; Garel *et al.*, 2000

<sup>5</sup> Corradi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004

<sup>6</sup> Kieslinger *et al.*, 2010

<sup>7</sup> Zhao *et al.*, 2006

<sup>8</sup> Jin *et al.*, 2010

<sup>9</sup> Wang *et al.*, 2002

<sup>10</sup> Crozatier *et al.*, 1996; 1999

<sup>11</sup> Crozatier und Vincent, 1999

<sup>12</sup> Nestoras *et al.*, 1997; Vervoort *et al.*, 1999

<sup>13</sup> Prasad *et al.*, 1998

<i>Xenopus laevis</i>	<i>Xcoe2</i>	Neurale Vorläuferzellen <sup>15</sup> Muskuläre Vorläuferzellen <sup>16</sup>	Spezifizierung von Neuronen <sup>15</sup> Muskelzell-Differenzierung <sup>16</sup>
<i>Xenopus laevis</i>	<i>Xcoe3</i>	Muskuläre Vorläuferzellen <sup>16</sup> Differenzierende Neuronen <sup>17</sup>	Muskelzell-Differenzierung <sup>16</sup> Differenzierung olfaktorischer Neuronen <sup>17</sup>

**Tab. 1.1 Übersicht der Ebf-Familienmitglieder.**

Hier gezeigt sind zu den jeweiligen Genen der Spezies ausgewählte Expressionsmuster und Funktionen, welche jedoch nicht alle Expressionen und Funktionen der jeweiligen Gene bzw. Proteine widerspiegeln.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, sind die Ebf-Faktoren in manchen Geweben nur einzeln, wie z.B. *Ebf1* in einigen Spinalneuronen (Garel *et al.*, 1999; Lobo *et al.*, 2008) und in B-Zellen (Medina *et al.*, 2004; Busslinger, 2004), in manchen jedoch auch koexprimiert. Aufgrund der Koexpression der Ebf-Faktoren unter anderem im olfaktorischen Epithel (Wang *et al.*, 2002), der Retina (Jin *et al.*, 2010) und postmitotischen Neuronen in Mittelhirn und Rückenmark (Garel *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004) und dem gleichzeitigen Ausbleiben eines Phänotyps z.B. im olfaktorischen Epithel von *Ebf1*<sup>-/-</sup> Mäusen, liegt die Hypothese nahe, dass die Familienmitglieder redundante Rollen einnehmen können (Garel *et al.*, 1997). Diese seit mehreren Jahren kontrovers diskutierte Komplementierung oder Redundanz scheint jedoch nicht prinzipiell sondern eher gewebespezifisch zu sein. So konnte Wang *et al.* (2004) Dosis-abhängige Defekte mit Hilfe von heterozygoten *Ebf2*<sup>+/-</sup>*Ebf3*<sup>+/-</sup> Tieren zeigen. In den Tieren war ein Defekt von olfaktorischen Rezeptorneuronen ähnlich zu den jeweils homozygoten Deletions-Tieren zu sehen, während andere Regionen des olfaktorischen Epithels jedoch nicht durch diesen Dosis-abhängigen Defekt beeinträchtigt waren. Die Redundanz-Hypothese wird gestützt durch die Beobachtung, dass der *knock-down* von z.B. *Ebf1* in retinalen Vorläuferzellen einen weniger starken Effekt auf die Differenzierung spezieller retinaler Zellen (nicht-AII glyzinerge amakrine Zellen und Typ 2 bipolare Zapfenzellen) als der *knock down* aller Ebf-Familienmitglieder ausübt (Jin *et al.*, 2010). *Knock-out*-Analysen von *Ebf1*, 2 und 3 bezüglich der Adipozyten-Differenzierung zeigten, dass die Deletion von *Ebf3* durch Ebf2 kompensiert wird, während jedoch die Deletion von *Ebf1* oder *Ebf2* keine Kompensierung des Phänotyps durch den jeweils anderen Faktor erlaubte (Jimenez *et al.*, 2007). Weiterhin wurde demonstriert, dass Ebf1 und Ebf2 unterschiedliche Funktionen bezüglich der Knochenbildung ausüben: Bei der Deletion von *Ebf1* war die Rate der

<sup>14</sup> Bally-Cuif *et al.*, 1998

<sup>15</sup> Dubois *et al.*, 1998

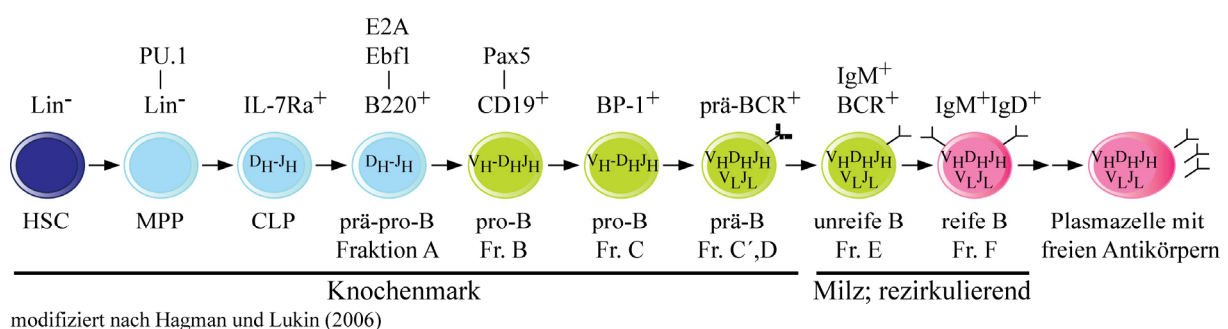
<sup>16</sup> Green und Vetter, 2011

<sup>17</sup> Pozzoli *et al.*, 2001

Knochenbildung erhöht, während die Deletion von *Ebf2* zu einer Reduktion der Knochendichte mit verstärkter Knochenresorption führte (Kieslinger *et al.*, 2005; Hesslein *et al.*, 2009). Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Familienmitglieder vermutlich in der Lage sind, sowohl spezifische als auch redundante Funktionen zu übernehmen.

### 1.1.3 Ebf1 – Der B-Zell-Regulator

B-Zellen werden, wie alle hämatopoetischen Zellen, aus hämatopoetischen Stammzellen entwickelt (Spangrude *et al.*, 1988). Die frühe B-Zell-Entwicklung ist hierbei auf einem komplexen Netzwerk von Transkriptionsfaktoren aufgebaut, die sich gegenseitig durch Rückkopplungsmechanismen und Wechselwirkungen beeinflussen können (Morrison und Weissman, 1994; Kondo *et al.*, 1997; DeKoter *et al.*, 2002; Igarashi *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2005; Nutt und Kee, 2007; Abb. 1.2). Die verschiedenen B-Zell-Stadien können nach zwei verschiedenen Nomenklaturen klassifiziert werden: Zum einen existiert die sogenannte Hardy-Nomenklatur, bei welcher die Stadien, je nach ihrer Expression von Oberflächenmarkern und somatischer Rekombination ihrer V-(variabel), D-(Diversität) und J-(joining) Gensegmente der schweren (H, *heavy*) und leichten (L, *light*) Immunglobulinketten, in sechs Fraktionen (A-F) eingeteilt werden (Hardy *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1993). Zum anderen gibt es die Nomenklatur nach Osmond, bei welcher die Zellen nach ähnlichen Kriterien in prä-pro-, pro-, prä-, unreife und reife B-Zellen klassifiziert werden (Osmond, 1990; Osmond *et al.*, 1992).



**Abb. 1.2 Ebf1 ist ein essentieller Faktor der B-Zell-Entwicklung.**

Schema der B-Zell-Entwicklung. Gezeigt ist die Entwicklung der hämatopoetischen Stammzelle (HSC) über MPP (*multipotent progenitor*), CLP (*common lymphoid progenitor*) zu den verschiedenen Stadien der B-Zell-Entwicklung bis hin zur reifen Plasmazelle. Angegeben ist zudem eine Auswahl an für das jeweilige Stadium typische erste Expression von Oberflächenmarkern und die somatische Rekombination der Gensegmente der variablen Domänen der schweren (H) und leichten (L) Immunglobulinkette. Die Deletion des jeweiligen Gens (*PU.1*, *E2A*, *Ebf*, *Pax5*) führt an eingezeichneter Stelle zu einem Block in der B-Zell-Entwicklung. Angegeben sind zwei alternative Nomenklaturen der verschiedenen Stadien bzw. Fraktionen (Osmond, 1990 und Osmond *et al.*, 1992; Hardy *et al.*, 1991 und Li *et al.*, 1993). Fr., Fraktion.

Selbst durch die Faktoren PU.1 (*Sp1*; Scott *et al.*, 1994; DeKoter und Singh, 2000) und IL-7R $\alpha$  (Interleukin 7 Rezeptor alpha; DeKoter *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 2004) reguliert, aktiviert Ebf1 kooperierend mit E2A (*Tcf2*; Bain *et al.*, 1994; Zhuang *et al.*, 1994; Kwon *et al.*, 2008) das Gen für Pax5 (BSAP, *B cell specific activator protein*; Adams *et al.*, 1992; Nutt *et al.*, 1998; O’Riordan und Grosschedl, 1999). Anschließend aktivieren E2A und Ebf1 gemeinsam mit Pax5 und Runx1 (Wang *et al.*, 1996a, b) das *Mb-1* (*Membrane bound 1*) Gen, welches gemeinsam mit B29 eine Komponente des prä-B-Zell- und des B-Zell-Rezeptors bildet (Akerblad *et al.*, 1999; Sigvardsson *et al.*, 2002).

Um die Bindung von Pax5 an den *Mb-1*-Promotor zu ermöglichen, aktiviert Ebf1 einen nukleosomalen Umbau der DNA des Promotors und reduziert damit dessen Methylierung (Maier *et al.*, 2004).

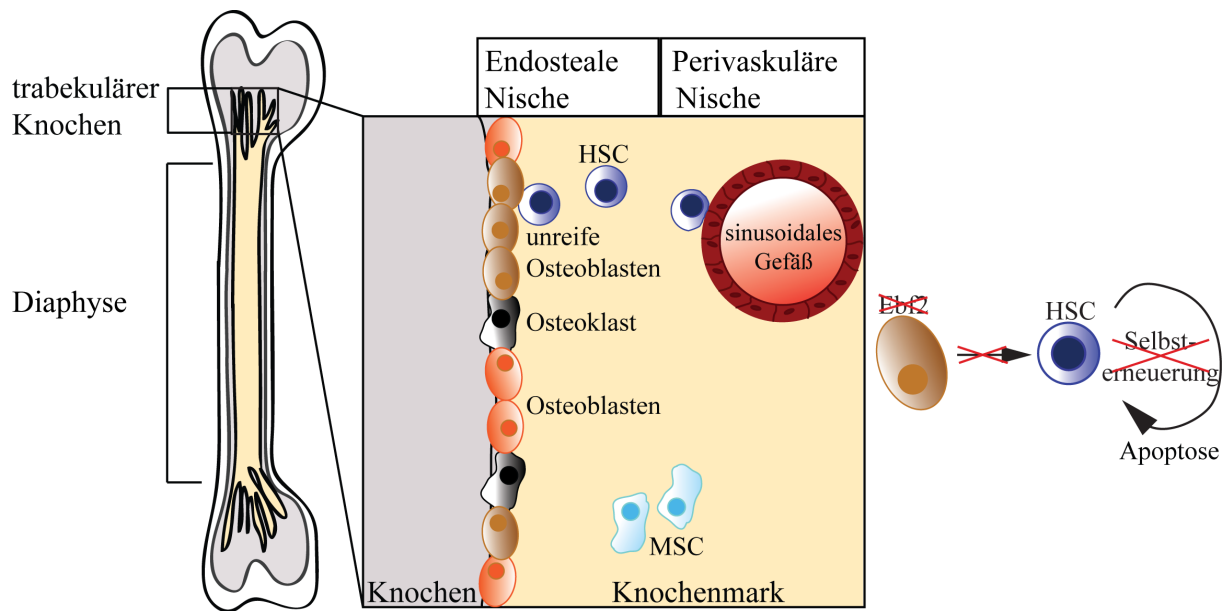
Wie bereits erwähnt, spielt Ebf1 eine essentielle Rolle als „Pionier-Faktor“ der B-Zell-Entwicklung (Lin und Grosschedl, 1995; Medina und Singh, 2005; Roessler *et al.*, 2007; Zandi *et al.*, 2008). So konnte von Lin und Grosschedl (1995) durch Deletion von *Ebf1* in der Maus gezeigt werden, dass bei Abwesenheit von Ebf1 die Entwicklung zwischen Fraktion A (prä-pro-B-Zellen) und Fraktion B (pro-B-Zellen) arretiert ist, wobei schon ein partieller Block zu Fraktion A hin zu detektieren war. Hierbei wurden zwar die B-Zell spezifischen Gene für *IL-7R $\alpha$* , *B220* und *CD43* noch exprimiert, aber die Expression von unter anderem Pax5, *Mb-1* und B29, aber auch von *Rag-1* und *Rag-2* (*Recombinant-activating gene*), welche wichtig für die Umordnung der Immunglobulin (Ig)-Gene sind (Oettinger *et al.*, 1990; Medina *et al.*, 2004) fehlten vollständig. Aber nicht nur Pax5, *Mb-1* und B29 werden durch die Expression von *Ebf1* reguliert, unter anderem werden auch *OcaB* (Pou2af1; Zandi *et al.*, 2008), *FoxO1* (Forkhead box O1; Zandi *et al.*, 2008), *VpreB* und  $\lambda 5$  (Lambda 5; Lin und Grosschedl, 1995) von Ebf1 in dem transkriptionellen Netzwerk der B-Zell-Entwicklung beeinflusst. Mittlerweile konnte mit Hilfe einer ChIP-on-Chip-Analyse (Chromatin-Immunpräzipitation und DNA-Microarray) die Liste der durch Ebf1 aktivierten, reprimierten oder in ihrer Chromatinstruktur modulierten Zielgene auf 565 Gene erweitert werden (Treiber *et al.*, 2010b). Die meisten dieser Zielgene sind in den Signalwegen des (prä)-B-Zell Rezeptors, Zelladhäsion und Zellmigration involviert. Aber nicht nur in der B-Zell-Entwicklung, sondern auch in neuronalen Entwicklungsprozessen (Garel *et al.*, 1997; 1999; Corradi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004) und der Regulation von Osteoblasten und Adipozyten (Kieslinger *et al.*, 2005; Jimenez *et al.*, 2007; Hesslein *et al.*, 2009) konnte Ebf1 als wichtiger Transkriptionsfaktor identifiziert werden.



### 1.1.4 Ebf2 – Wichtig zum Erhalt hämatopoetischer Stammzellen

Das zweite murine Mitglied der Ebf-Familie, *Ebf2*, kann in der Embryonalentwicklung unter anderem in zwei Kiemenbögen, dem knochenbildenden Sklerotom, braunem Fettgewebe und neuralen Geweben wie diversen Ganglien und Regionen des Gehirns detektiert werden (Malgaretti *et al.*, 1997; Corradi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Kieslinger *et al.*, 2005). Weiterhin ist der Faktor in den unreifen Osteoblasten des Knochenmarks exprimiert (Kieslinger *et al.*, 2005). So konnte mit Hilfe des murinen Deletions-Modelles von Corradi *et al.* (2003) gezeigt werden, dass sowohl Größe und Gewicht der Tiere als auch ihrer Röhrenknochen selbst drastisch reduziert sind. Zu dem Knochen-Phänotyp sind auch neuronale Defekte und eine verminderte Zellularität in hämatopoetischen Organen wie dem Thymus zu beobachten (Corradi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Kieslinger *et al.*, 2005; 2010). Kieslinger *et al.* (2005) zeigte, dass die Knochenbildungsrate selbst normal ist, jedoch die Knochendichte reduziert (um 40 %) und die Knochenresorption um 50 % erhöht ist. Während die Osteoblasten die Grundlage der extrazellulären Knochenmatrix darstellen, sind die Osteoklasten wichtig für die Knochenresorption (Karsenty und Wagner, 2002; Teitelbaum und Ross, 2003; Baron, 2004).

Im Knochenmark reguliert Ebf2 aber nicht nur die Osteoblasten-abhängige Differenzierung von Osteoklasten durch die Aktivierung des *Opg* Genes (Osteoprotegerin), sondern auch den Erhalt hämatopoetischer Stammzellen (HSC; Kieslinger *et al.*, 2005; 2010; Hiechinger, 2010). Die Zahl der HSC im Knochenmark von *Ebf2*<sup>-/-</sup>-Tieren ist um das ca. 3-fache reduziert. Da bereits 2003 von Calvi *et al.* gezeigt wurde, dass osteoblastäre Zellen die hämatopoetische Stammzell-Nische (endosteale Nische, Lord *et al.*, 1975) regulieren, liegt es nahe, dass Ebf2 ein wichtiger Faktor zum Erhalt der HSC ist (Abb. 1.3). So konnte von Kieslinger *et al.* (2010) demonstriert werden, dass die Aktivität der HSC aufgrund reduzierter Expression wichtiger Stammzell-unterstützender Faktoren nach Deletion von *Ebf2* stark vermindert ist. Weiterhin konnte in dieser Veröffentlichung mittels adoptivem Transfers von HSC aus *Ebf2*<sup>-/-</sup>-Tieren in Wildtyp-Tiere und Kokultur-Experimenten veranschaulicht werden, dass die Reduktion der HSC auf Veränderungen des stromalen Umfelds und nicht auf Zell-autonome Prozesse zurück zu führen ist.



modifiziert nach Yin und Lin (2006), Wilson und Trump (2006) und Hiechinger (2010)

**Abb. 1.3 Ebf2 ist wichtig zum Erhalt hämatopoetischer Stammzellen.**

Modell der Stammzell-Nische. In der trabekulären Zone des Knochens befindet sich die endosteale Nische mit unreifen, *Ebf2*-exprimierenden Osteoblasten und Osteoklasten. Die perivaskuläre Nische ist gekennzeichnet durch sinusoidale Gefäße. Durch die Deletion von *Ebf2* konnte bei Kieslinger *et al.* (2010) gezeigt werden, dass die Zahl der hämatopoetischen Stammzellen (HSC) stark reduziert ist, was auf eine Stammzell-erhaltende Funktion von *Ebf2*-exprimierenden unreifen Osteoblasten hindeutet. MSC, mesenchymale Stammzellen.

### 1.1.5 Ebf3 – Die Deletion führt zu neonataler Letalität

Der Phänotyp der homozygoten Deletion von *Ebf3* gehört zu den drastischsten Phänotypen der Ebf-Familie, da er neonatal letal ist (Wang *et al.*, 2004). Warum jedoch die Deletion von *Ebf3* zu neonataler Letalität führt, ist bisher ungeklärt. So ist *Ebf3* ab dem embryonalen Tag E10.5 pc in der Mantelschicht des Hinterhirns und später auch in spezifischen Bereichen des Gehirns (z.B. in vestibulären und cerebellaren Nuklei) und in adulten Geweben wie Herz und Skelettmuskel, aber auch in Adipozyten und Gehirnregionen wie dem olfaktorischen Epithel (Garel *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997; 2002; Jimenez *et al.*, 2007) exprimiert. Weitere Expressionsanalysen zeigten eine Expression unter anderem in postmitotischen Neuronen des Gehirns und den mesenchymalen Zellen der Beinanlagen (Corradi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Mella *et al.*, 2004). Keine Expression konnte in Milz, Lunge, Leber und Niere detektiert werden (Garel *et al.*, 1997). Weiterhin konnte für das Protein eine Rolle in Zellwachstum, Proliferation und Apoptose ermittelt werden (Zhao *et al.*, 2006). So wurde mittels Überexpression der Wildtyp-Variante und einer nicht-funktionellen Mutante in verschiedenen Tumorzell-Linien gezeigt, dass Ebf3 durch Induktion von Zellzyklus-Inhibitoren der Cip/Kip Familie von CDKI (*cyclin dependend kinase inhibitors*) und gleichzeitiger Repression von cyklin-abhängigen Kinasen zu vermindertem Zellwachstum führt. Weiterhin wurde demonstriert, dass es in diesen Zellen durch eine Hemmung von

antiapoptotischen Faktoren wie Mcl-1 (Michels *et al.*, 2005) und Daxx (Zhao *et al.*, 2004) zu einer verstärkten Apoptose kommt (Zhao *et al.*, 2006). Die Rolle von Ebf3 in Zellwachstum, -migration und -tod wurde kürzlich durch Kim *et al.* (2011) anhand verschiedener, von Magenkarzinomen abgeleiteter Tumorzelllinien weitergehend verifiziert. Durch die Überexpression von *Ebf3* wurden das Wachstum und die Migration der Tumorzellen inhibiert und gleichzeitig die Expression der Zellzyklus-inhibierenden Gene p21 (Harper *et al.*, 1993) und p27 (Polyak *et al.*, 1994) aktiviert. Da das Gen zudem in diversen Gehirntumoren (Zardo *et al.*, 2002; Parsons *et al.*, 2008), Brustkrebs (Neve *et al.*, 2006), Magenkrebs (Kim *et al.*, 2011), Pankreas- (Jones *et al.*, 2008) und Lebertumoren (Chen *et al.*, 2002) deletiert, mutiert oder hypermethyliert ist, scheint demnach Ebf3 eine suppressive Funktion für Tumoren zu besitzen.

### **1.1.6 Ebf4 – Ein Transkriptionsfaktor bisher unbekannter Funktion**

*Ebf4* wurde 2002 von Wang *et al.* mittels einer neuen Screening-Methode entdeckt. Erste Analysen der Gruppe zeigten, dass *Ebf4* ebenso wie die anderen Familienmitglieder im olfaktorischen Epithel, aber auch in Lunge, Milz und Niere exprimiert ist. Die Expression in der Retina des Auges wurde 2010 von Jin *et al.* weitergehend verifiziert. Erste funktionelle Analysen zeigten, dass Ebf4 jedoch im Gegensatz zu den anderen Familienmitgliedern eher eine hemmende Funktion in Bezug auf die Transaktivierung besitzt. Eine im Vergleich zu den anderen Faktoren äußerst geringe Transaktivierung wurde von Wang *et al.* (2002) nicht nur mit der prädominanten Form, sondern auch mit allen bekannten Speißvarianten von Ebf4 beobachtet. Durch weitere Analysen wurde in der Veröffentlichung demonstriert, dass diesem Phänomen nicht eine unzureichende Bindung an die Ebf-Konsensussequenz zu Grunde lag. Damit lag die Hypothese nahe, dass Ebf4 eine negativ-regulierende Rolle einnehmen könnte. Möglicherweise steuert und reguliert der Faktor über die Bildung von Heterodimeren die Funktion der anderen Familienmitglieder (Wang *et al.*, 2002). Dieser Regulationsmechanismus könnte auf der mit 57 % sehr viel geringeren Homologie der TAD (Abb. 1.1A) von Ebf4 und damit einer eventuell anderen Funktionalität begründet sein. Was jedoch die genauen biologischen und biochemischen Funktionen dieses Faktors sind, ist bisher ungeklärt.

## 1.2 Die Entwicklung der quergestreiften Muskulatur

### 1.2.1 Mesenchymale Stammzellen – Die Grundlage der Muskeln

Die Entwicklung muriner Embryonen ist ein hierarchisch aufgebauter, gut beschriebener Vorgang (Kaufman, 1992). Nach der Befruchtung und den ersten Zellteilungen findet eine erste Polarisierung des Embryos im Blastozysten-Stadium (E3 pc; embryonaler Tag *post coital*) statt. Im nächsten Stadium (E5.5 pc) kommt es in der Maus zur Ausformung von Epiblast und viszeralem Endoderm. Ca. einen Tag später ist das Stadium der Gastrula erreicht, bei welchem die drei embryonalen Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) entwickelt werden (Spemann, 1938; Snow und Tam, 1980).

Die Funktion von Stammzellen als „undifferenzierte Zellen mit der Fähigkeit der Selbsterneuerung und Pluripotenz“ wurde am Beispiel der hämatopoetischen Stammzellen (HSC) definiert, da diese Zellen auch bei wiederholter Transplantation in der Lage waren, das gesamte hämatopoetische System wieder herzustellen (Domen und Weissman, 1999). Durch *in vitro*-Studien und Transplantationsexperimente konnte mittlerweile auch die Pluripotenz von mesenchymalen Stammzellen (MSC) gezeigt werden (Friedenstein *et al.*, 1970; 1976; Jiang *et al.*, 2002). Die Multipotenz der MSC sowie die Fähigkeit der Selbsterneuerung konnte 2007 von Sacchetti *et al.* mittels Transplantation von CD146<sup>+</sup>-Fibroblasten gezeigt werden.

So entstehen aus den MSC neben Myozyten (Bildung der Muskulatur) auch der Großteil der stromalen Zellen, wie Chondrozyten (Knorpelbildung), Osteoblasten (Knochenbildung) und Adipozyten (Fettbildung). Weitere aus ihnen differenzierende Zellen sind zudem Fibroblasten (Bindegewebe) und Endothelzellen (Gefäßbildung) (Phinney, 2002; Short *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006; Abb. 1.4A).

Seit 1970 (Friedenstein *et al.*) erforscht, werden MSC derzeit in Durchflusszytometrie-Analysen als positiv für die Oberflächenmarker *CD29*, *CD44*, *CD105*, *CD90*, *CD73* und *Scal* beschrieben. Zudem exprimieren MSC nicht die Oberflächenmoleküle *CD34*, *Ter119*, *CD45*, *CD14* und *CD11b*. Nach wie vor ist es jedoch schwierig, eine reine MSC-Population zu erhalten (Sung *et al.*, 2008; Augello *et al.*, 2010).

### 1.2.2 Von der mesenchymalen Stammzelle bis zur Muskelfaser

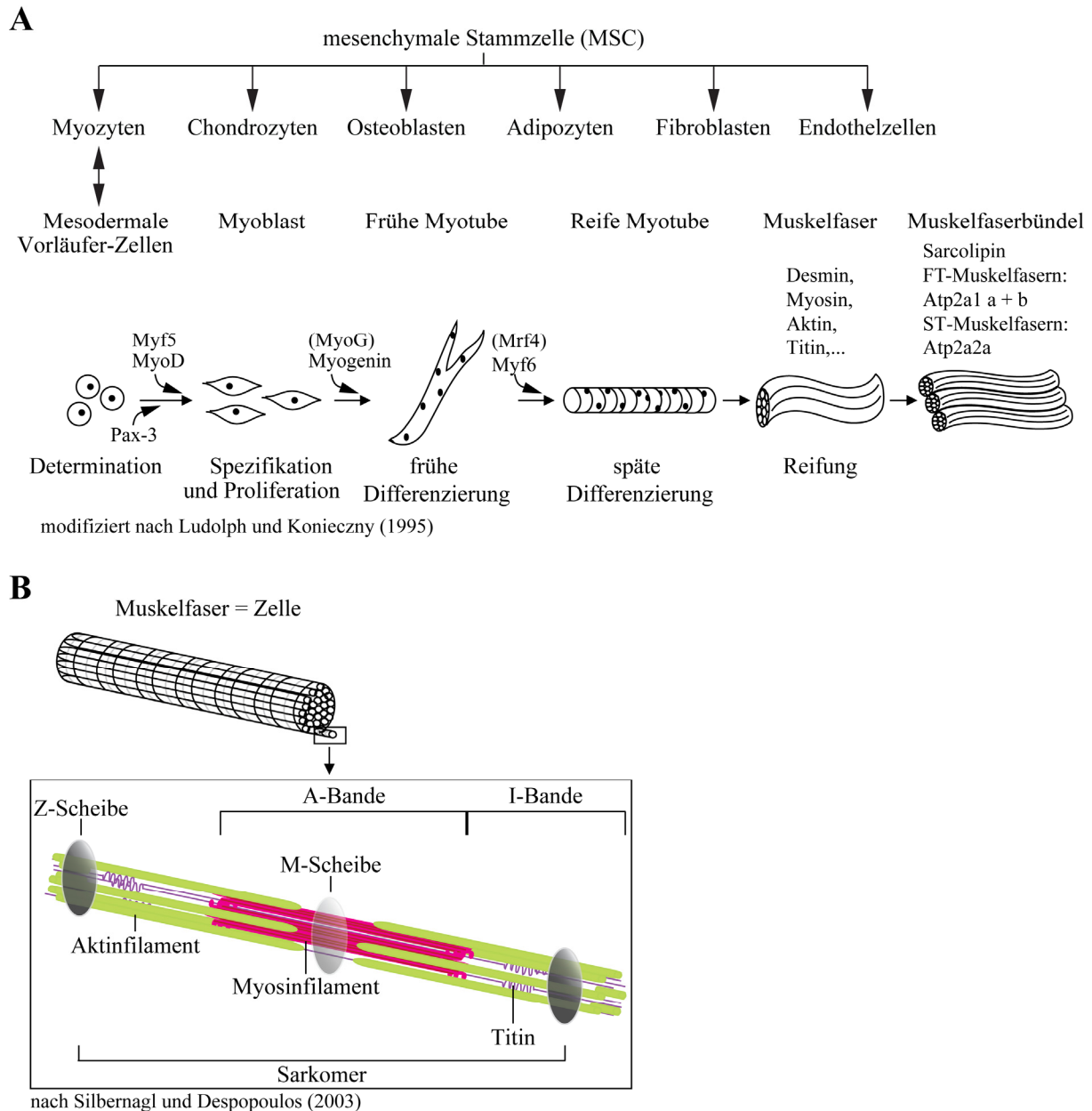
Ab dem Stadium der Neurula (E8 pc) wird der Grundstein zur Entwicklung der Muskulatur gelegt: Mesodermale Zellen nahe des Neuralrohrs segmentieren sich zu Somiten (Rugh, 1968; Chevallier *et al.*, 1977; Ordahl und Le Douarin, 1992; Pourquie, 2000; 2001). In den anterior

gelegenen Somiten wird dabei im hypaxialen Bereich das Dermomyotom gebildet, in welchem das Programm der Muskelentwicklung gestartet und aus MSC mesodermale Vorläufer-Zellen gebildet werden (Brent *et al.*, 2003; Christ *et al.*, 2007; Abb. 1.4A). Die Expression von *Pax3* (*Paired box*) und *Pax7* in diesen Zellen ist essentiell für das Voranschreiten der Muskelentwicklung, da vor allem *Pax3* die Expression von *Myf5* (*Myogenic factor*) aktiviert (Goulding *et al.*, 1994; Bajard *et al.*, 2006; Buckingham, 2007; Abb. 1.4A).

Gemeinsam mit *Pax3* aktiviert *Myf5* die Expression von *MyoD* (*Myogenic determination factor*, *Myf3*), was zur Ausbildung des Myoblasten führt (Tajbakhsh *et al.*, 1997; Brunelli *et al.*, 2007). Durch die Expression von *MyoG* (Myogenin; Hasty *et al.*, 1993; Nabeshima *et al.*, 1993) wird die Differenzierung der Myoblasten in Myotuben initiiert. Die Fusion der Zellen und damit die Bildung von polynukleären Myotuben und anschließende Reifung zu Muskelfasern wird durch die Expression von *Myf6* (*Mrf4*; Patapoutian *et al.*, 1995) unterstützt (Mintz und Baker 1967).

Mesenchymale Stammzellen können auch im adulten Tier in selbstprolongierende muskuläre Vorläuferzellen differenzieren, welche wiederum in das myogene Programm eintreten und damit die Muskelregeneration beginnen können (Leeper *et al.*, 2009; Mitchell *et al.*, 2010).

Eine Muskelfaser wird in sogenannte Sarkomere eingeteilt. Dies sind funktionelle Einheiten zwischen zwei Z-Scheiben (Zwischen-Scheiben; Abb. 1.4B). Bei der Muskelkontraktion kommt es nach der Signalweiterleitung der Motoneuronen zu einem Einstromen von  $\text{Ca}^{2+}$  (Kalzium) aus dem sarko(endo)plasmatischen Retikulum in das Zytosol (Kargacin und Kargacin, 1994; Shull, 2000). Dabei bindet es an das Troponin der Aktinfilamente (zudem bestehend aus Tropomyosin- und  $\alpha$ -Aktin-Proteinmolekülen; Zot und Potter, 1987) und regt die ATP (Adenosin-Tri-Phosphat)-abhängige Bewegung der Myosinköpfe der Myosinfilamente durch Konformationsänderung an den Aktinfilamenten an, wodurch sich die Z-Scheiben einander nähern. I- (isotroper Bereich des Sarkomers) und A- (anisotroper Bereich des Sarkomers) Banden werden kürzer und der Muskel kontrahiert. Zur Lösung der Kontraktion wird das  $\text{Ca}^{2+}$  wieder aus dem Zytosol in das Lumen des sarko(endo)plasmatischen Retikulums zurück gepumpt (Jewett *et al.*, 1971; Silbernagl und Despopoulos, 2003). Unterstützt wird die Relaxation durch das in FT-Muskelfasern vorhandene Paralbumin.



**Abb. 1.4 Die Muskelentwicklung von mesodermalen Vorläufer-Zellen bis hin zur Muskelfaser.**

(A) Schema der Differenzierungswege von mesenchymalen Stammzellen (MSC) und der Muskelentwicklung (Skelettmuskulatur) modifiziert nach Ludolph und Konieczny (1995). Während der Entwicklung spielen die jeweils eingezeichneten Faktoren der MRF-Familie (*myogenic regulatory factors*) eine entscheidende Rolle und werden ab dem gekennzeichneten Stadium in den Zellen exprimiert. Ab dem Stadium der Myotube findet eine Fusion der einzelnen Zellen zu polynukleären Zellen (Muskelfaser) statt. In Klammern wurde ggf. eine alternative Nomenklatur der Faktoren angegeben. FT, *Fast Twitch*; ST, *Slow Twitch*. (B) Skizzierter Aufbau eines Sarkomers nach Silbernagl und Despopoulos, 2003.

Das in Abb. 1.4B eingezeichnete fadenförmige Protein Titin dient der Positionierung des Myosinfilaments und bestimmt die Verkürzungsgeschwindigkeit des Muskels. Das Typ-III Intermediärfilament Desmin dient der strukturellen und mechanischen Integrität der Zelle und verbindet den kontraktilen Apparat mit dem subsarkolemalem Zytoskelett (Ishikawa *et al.*, 1968; Lazarides und Hubbard, 1976; Fuchs und Weber, 1994; Wede *et al.*, 2002).

Die oben beschriebenen essentiellen Faktoren der Muskelentwicklung, Myf5, MyoD, MyoG und Myf6 gehören zur Familie der MRF (*Myogenic regulatory factors*), welche eine 13 Aminosäuren (AS) lange basische DNA-Binde-Domäne (*basic* DBD) und daran anschließend eine Klasse 2-bHLH (*basic* Helix-Loop-Helix)-Domäne von einer Länge von 40 AS zur Homo- und Heterodimerisierung und Bindung an E2-Box-Sequenzen (Murre *et al.*, 1989a; b) besitzen. Die MRF-Familie ist nicht nur in Säugetieren hoch konserviert, sondern auch z.B. in Vögeln und Amphibien zu finden (Sassoon, 1993; Zhang *et al.*, 1999). Eine redundante Funktion von Myf5 und MyoD (Rudnicki *et al.*, 1992), aber auch von MyoG und Myf6 (Zhang *et al.*, 1995) konnte bereits aufgezeigt werden.

### 1.2.3 Das Diaphragma

Die unter Punkt 1.2.2 beschriebene Entwicklung der quergestreiften Muskulatur gilt nicht nur für die Entwicklung der Skelettmuskulatur, sondern auch für die des Diaphragmas. So besteht dieses aus einem Bereich von Muskelzellen, welche wie oben beschrieben aus muskulären Vorläuferzellen des Dermomyotoms entstehen (Christ und Ordahl, 1995; Birchmeier und Brohmann, 2000). Zudem besteht das Diaphragma auch aus Bindegewebe, Blutgefäßen und Nerven, welche aus anderen mesodermalen Bereichen entstehen (Sweeney, 1998). Während im äußeren Bereich gestreifte Muskulatur zu finden ist, ist der zentrale Sehnenbereich unmuskulös. Anatomisch gesehen teilt das für die Atmung wichtige Diaphragma den Körper in Brust- und Bauchraum ein und wird nur durch die Öffnungen für Aorta, Vene und Speiseröhre durchbrochen (Kaufman, 1992). So wird während der Atmung das Diaphragma bei der Inspiration angespannt und dadurch in den Bauchraum abgesenkt, während es bei der Expiration entspannt wird und passiv durch die Bauchdecke wieder in den Brustraum gedrängt wird (Silbernagl und Despopoulos, 2003). Die Expression von z.B. *MyoG* in den Muskelzellen des Diaphragmas ist unerlässlich, da bei Deletion keine detektierbare Muskulatur zu erkennen ist (Tseng *et al.*, 2000). Bei Fehlen von MyoD dagegen wird das Muskelgewebe des Diaphragmas ausgebildet, ist jedoch dünner (Kablar *et al.*, 2003).

### 1.2.4 Die Rolle von Serca1

Neben den MRF ist auch die Expression von *Atp2a1* für die Funktionalität des Diaphragmas wichtig. *Atp2a1* kodiert für das zur Familie der Serca-Proteine gehörende Serca1 (Sarko(endo)plasmatische Retikulum-Kalzium-ATPase). Die Familie besteht aus mehreren Serca-Proteinen, welchen 3 *Atp2a*-Gene zu Grunde liegen (MacLennan *et al.*, 1985; Brandl *et*

*al.*, 1986; Burk *et al.*, 1989; Lalli *et al.*, 2001). Während die beiden Isoformen *a* (adult) und *b* (neonatal) von *Atp2a1* vor allem in FT-Muskelfasern (*Fast Twitch*, schnell zuckend) exprimiert werden, spielt Serca2a vor allem in Herz- und ST-Muskelfasern (*Slow Twitch*, langsam zuckend) eine große Rolle (Brandl *et al.*, 1987; Jorgensen *et al.*, 1988; Wu und Lytton, 1993). *Atp2a2b* und *Atp2a3* dagegen sind universell exprimiert (Burk *et al.*, 1989; Wuytack *et al.*, 1992; Lytton *et al.*, 1992). Die in den Muskelfasern befindlichen Proteine Serca1 und Serca2a regulieren bei der Muskelentspannung den ATP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$  Transport aus dem Zytosol in das Lumen des sarko(endo)plasmatischen Retikulums (Carafoli, 1987; MacLennan *et al.*, 1997). Sie gelten dabei als zentrale Determinante muskulärer Kontraktilität, da sie als limitierender Schritt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und -Speicherung die Relaxationsgeschwindigkeit des Muskels bestimmen (Carafoli, 1987; Bers und Bridge, 1989; Minamisawa *et al.*, 1999). Die Aktivität dieser Serca-Varianten wird durch Phospholamban (Herzmuskulatur; Simmerman und Jones, 1998) und Sarcoplin (Skelettmuskulatur; Odermatt *et al.*, 1998) reguliert. Das transmembrane Protein Sarcoplin moduliert dabei die Aktivität von Serca1 in zwei Konzentrations-abhängigen Mechanismen: Bei niedrigen Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$  wird die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in das Sarko(endo)plasmatische Retikulum reduziert, bei einer gesättigten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dagegen wird der Transport erhöht und die Aufnahmerate durch Serca1 stimuliert (Odermatt *et al.*, 1998). Die wechselnde  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der Serca1-Pumpe ist auf die Bindung von Sarcoplin an die transmembrane Domäne von Serca1 zurück zu führen (Asahi *et al.*, 2003a; b). Überexpressionsstudien mit *Atp2a1* und *Atp2a2* in kultivierten Kardiomyozyten zeigten, dass dies zu vermehrter muskulärer Kontraktilität und erhöhtem  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport bei gleichzeitig gesteigerter Relaxation führt (Inesi *et al.*, 1998; Sumbilla *et al.*, 1999).

Eine mit Mutationen von *Atp2a1* assoziierte Erkrankung ist die Brody-Erkrankung (*Brody Disease*; Brody 1969; Karpati *et al.*, 1986; Taylor *et al.*, 1988). Die verzögerte Relaxation der Skelettmuskulatur konnte in 50 % der Fälle (Karpati und MacLennan, 1999) auf eine verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, bedingt durch Mutationen oder Deletionen des *Atp2a1*, zurückgeführt werden (Benders *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995; Odermatt *et al.*, 2000). Was in der anderen Hälfte der Fälle zu dieser Erkrankung führt, ist bisher ungeklärt. Zur Aufklärung der Brody-Erkrankung wurde ein murines *Atp2a1*-Deletions-Mausmodell generiert, bei welchem jedoch ein von dem Menschen abweichender Phänotyp beobachtet wurde (Pan *et al.*, 2003): Die homozygoten Tiere litten unter fortschreitender Zyanose, Schnappatmung und starben kurz nach der Geburt. In weitergehenden Analysen konnte die

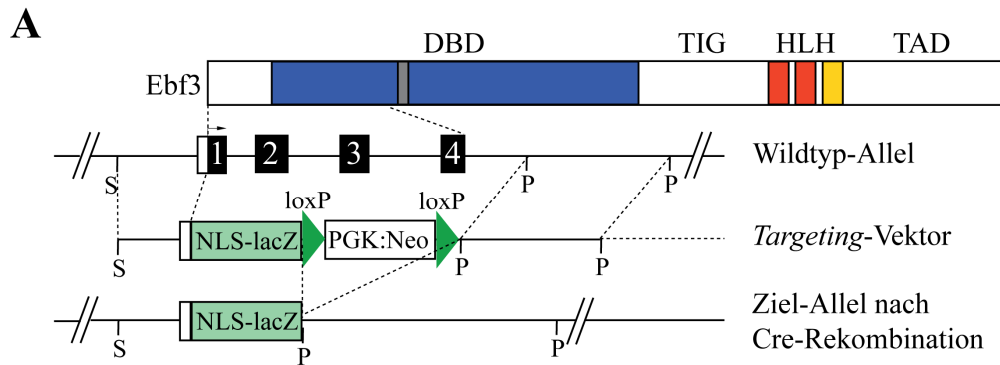


Arbeitsgruppe zeigen, dass die Deletion von *Atp2a1*, wie im Menschen, zu einer verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, aber auch zu einer Hyperkontraktion des Diaphragmas führt.

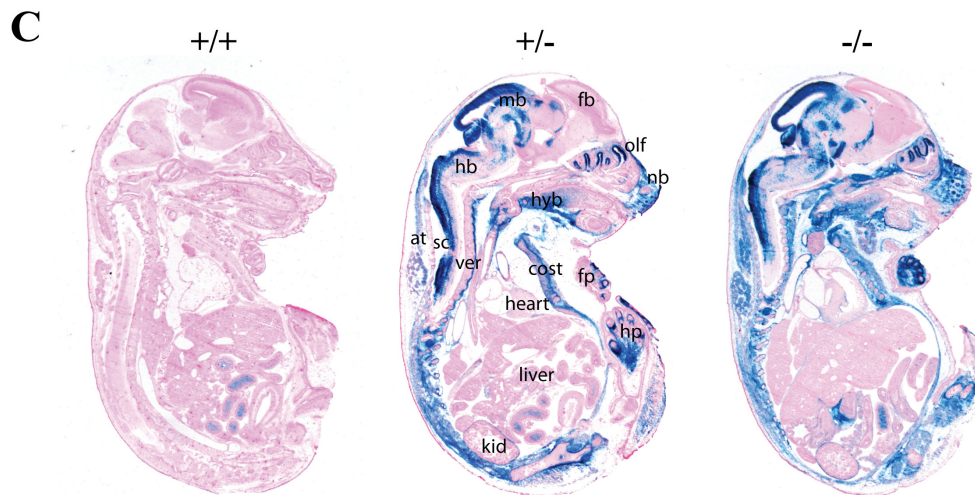
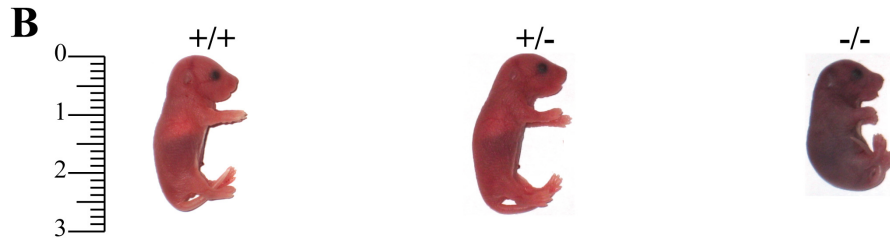
### **1.2.5 Ebf3 – Spielt der Transkriptionsfaktor eine Rolle in der Entwicklung des Diaphragmas?**

Wie auch bei der Deletion von *Atp2a1* kommt es durch die Deletion von *Ebf3* (bisher unpubliziertes Mausmodell von M. Garcia-Dominguez und P. Charnay, Institut der Biologie, Ecole Normale Supérieure, Paris; Abb. 1.5A) zu einer neonatalen Letalität der homozygoten Tiere. Von Größe und Gewicht nicht von den anderen Genotypen zu unterscheiden, sind die homozygoten Deletionstiere zyanotisch, zeigen eine Schnappatmung und sterben wenige Minuten nach der Geburt (Abb. 1.5B). Im embryonalen Stadium, aber auch kurz nach der Geburt zeigen die Würfe von heterozygoten Elterntieren eine normale Mendelsche Verteilung (E18.5 pc: 20 % *Ebf3*<sup>-/-</sup>, 46 % *Ebf3*<sup>+/-</sup>, 33 % *Ebf3*<sup>+/+</sup>; n=350).

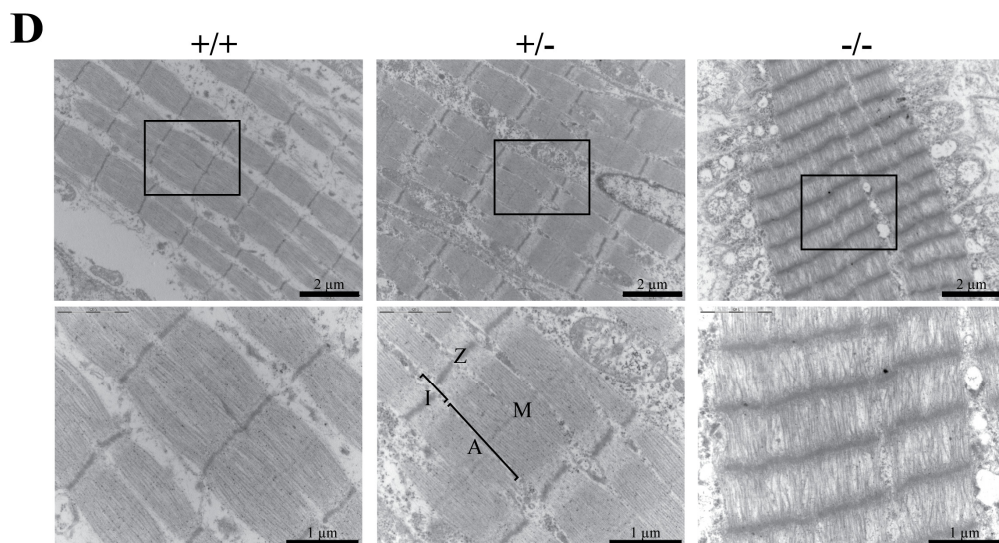
Durch eine  $\beta$ -Gal-Färbung ( $\beta$ -Galaktosidase; E16.5 pc Embryonen; Dr. Saihong Jin, HMGU München) konnte eine starke Expression von *Ebf3* in neuralen Geweben, Knochen, Beinanlagen und Diaphragma detektiert werden, während *Ebf3* offensichtlich nicht in Lunge, Herz und Leber exprimiert ist (Abb. 1.5C). Mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung longitudinaler Paraffinschnitte von E18.5 pc Embryonen konnte bereits von Dr. Gerald Burgstaller (HMGU München) in Kooperation mit Dr. Tanja Klein-Rodewald (HMGU München) gezeigt werden, dass die Lunge normal entwickelt ist (Daten bisher nicht veröffentlicht). Zudem wurde eine mit Wildtyp-Tieren vergleichbare Größe der Muskelfasern des Diaphragmas beobachtet (Daten bisher nicht veröffentlicht). Weiterhin konnte durch Dr. S. Jin (HMGU München) mit Hilfe von Knochenschnitten und von-Kossa-Färbungen ein normaler Knochenaufbau demonstriert werden (Daten bisher nicht veröffentlicht). In elektronenmikroskopischen Analysen durch Dr. Petra Kopp (HMGU München) und Dr. Tanja Klein-Rodewald (HMGU München) konnte eine Hyperkontraktion der Myofasern ähnlich der *Atp2a1*-Deletion detektiert werden. Wildtyp- und heterozygote *Ebf3*<sup>+/-</sup>-Tiere zeigten dagegen eine normale Ultrastruktur von dicht gepackten Myofibrillen (A- und I-Bande, M- und Z-Linie; Abb. 1.5D; Daten bisher nicht veröffentlicht).



Dr. M. Garcia-Dominguez und Prof. Dr. P. Charnay (Ecole Normale Supérieure, Paris)



Dr. S. Jin (HMGU München)



Dr. P. Kopp und Dr. T. Klein-Rodewald (HMGU München)

**Abb. 1.5 Die Deletion von *Ebf3* ist neonatal letal und ähnlich dem Phänotyp der Deletion von *Atp2a1*.**

(A) Deletions-Strategie von *Ebf3* nach M. Garcia-Dominguez und P. Charnay (Ecole Normale Supérieure, Paris). Gezeigt sind die ersten 4 kodierenden Exons. Mit grünen Pfeilköpfen sind Orientierung und Lage der

*loxP*-Sequenzen gekennzeichnet. Das Startcodon von Exon 1 und die *downstream* folgende *PstI*-Restriktionsschnittstelle (P) wurden zur Insertion einer NLS-*lacZ*-Reporterkassette und einer Neomycin-Resistenzkassette genutzt. Gestrichelte Linien skizzieren die jeweils korrespondierenden Teile der genomischen DNA. Die Situationen des Wildtyp-Allels, des *Targeting*-Vektors und des Target Allels nach der Rekombination mit der PGK-*Cre*-Rekombinase wurden dargestellt. S, *SacI*. **(B)** Repräsentatives Bild der möglichen Genotypen einer Verpaarung von heterozygoten *Ebf3*<sup>+/-</sup>-Mäusen ca. 10 min nach der Geburt. **(C)**  $\beta$ -Gal-Färbung von E16.5 pc Embryonen durchgeführt von Dr. S. Jin (HMGU München). at, *adipose tissue* (adipöses Gewebe); cost, *costals* (Rippen); fb, *forebrain* (Vorderhirn); fp, *forepaw* (Vorderbein); hb, *hindbrain* (Hinterhirn); heart, Herz; hp, *hindpaw* (Hinterbein); hyb, *hyoid bone* (Zungenbein); kid, *kidney* (Niere); liver, fötale Leber; mb, *midbrain* (Mittelhirn); nb, *nasal bone* (nasaler Knochen); olf, olfaktorisches Epithel; sc, *spinal cord* (Rückenmark); ver, *vertebrae* (Rückenwirbel). **(D)** Repräsentative Bilder von mittels Elektronenmikroskopie analysierten Diaphragmen von d0,5 Tieren (Dr. P. Kopp und Dr. T. Klein-Rodewald, beide HMGU München).

So ergeben sich aufgrund dieser ersten Analysen folgende Parallelen zur Deletion von *Atp2a1* (Pan *et al.*, 2003): Die Tiere leiden unter fortschreitender Zyanose und Schnappatmung und sterben wenige Minuten nach der Geburt. Die mangelhafte Atmung könnte aufgrund einer detektierbaren Hyperkontraktion in direktem Zusammenhang mit dem Diaphragma stehen. Da *Ebf3* jedoch auch in den Rippenbögen exprimiert ist, könnte auch hier ein negativer Einfluss auf die Atmung begründet sein. So scheint die Deletion von *Ebf3* nur eine partielle Phänokopie der *Atp2a1*-Deletion darzustellen.

### 1.3 Fragestellung der Arbeit

Die Familie der Ebf-Faktoren ist strukturell sowohl untereinander als auch evolutionär hoch konserviert. Funktionell gesehen können die Proteine spezifische aber vermutlich auch gewebsabhängig redundante Rollen in Entwicklungsprozessen einnehmen. Während die Rolle von Ebf1 als ein Schlüsselfaktor der B-Zell-Entwicklung bereits sehr gut beschrieben wurde und die Identifikation von Ebf2 als wichtiger Stammzell-erhaltender Faktor gelang, ist jedoch kaum etwas über die Funktion der murinen Familienmitglieder Ebf3 und Ebf4 bekannt.

Um die Funktion von Ebf3 näher zu analysieren sollte in dieser Arbeit nicht nur das Expressionsmuster von *Ebf3*, sondern auch der Phänotyp einer Deletion charakterisiert werden. Da die Deletion von *Ebf3* große Ähnlichkeiten zum Phänotyp der *Atp2a1*-Deletion zeigt, welcher sich unter anderem in einer Dysfunktion des Diaphragmas äußert, könnte Ebf3 zum einen eine Rolle in der Entwicklung, zum anderen in der Funktion des Diaphragmas spielen. Zur Klärung, inwieweit Ebf3 die Funktion des Diaphragmas beeinflusst, sollte in dieser Arbeit *in vivo* als auch *in vitro* analysiert werden, ob *Atp2a1* ein mögliches Zielgen des Ebf-Faktors darstellt. Um eine mögliche Rolle im Zusammenspiel der Muskelentwicklung, respektive des Diaphragmas nachzuweisen, sollte weiterhin der Einfluss von Ebf3 auf die Expression von Muskelgenen untersucht werden.

Nach einer ersten, publizierten Charakterisierung scheint es, dass Ebf4 ein Negativ-Regulator der anderen Familienmitglieder sein könnte. Ziel dieser Arbeit war es, die biologische und biochemische Funktion von Ebf4 näher zu charakterisieren und mit Hilfe von funktionellen Analysen herauszukristallisieren, inwieweit Ebf4 tatsächlich ein Negativ-Regulator der Transkriptionsaktivität der anderen Familienmitglieder darstellt. Zudem sollte mittels Expressionsstudien die Grundlage zur Untersuchung der biologischen Funktion von Ebf4 geschaffen werden. Ein weiteres Ziel war die Entwicklung und Etablierung eines murinen Deletions-Modells.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

Alle nicht gesondert oder unter Methoden (siehe 2.2) aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe), Merck Biosciences GmbH (Darmstadt), Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen), Gibco (Karlsruhe), Qiagen (Hilden), Invitrogen (Eggenstein), peqLab (Erlangen) oder Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

#### 2.1.1 Ausstattung

Ausstattung	Bezugsquelle
Agarosegelelektrophorese-Apparatur	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Bakterienschüttler	Innova 44; Eppendorf, Hamburg
CO <sub>2</sub> -Inkubator	CB150; Binder, Tuttlingen
Dispergiergerät	Ultra Turrax T25; IKA, Staufen
Durchflusszytometer	FACS Calibur <sup>TM</sup> ; BD Biosciences FACS Aria <sup>TM</sup> III; BD Biosciences, Heidelberg
Elektroporationssystem	Gene Pulser; Biorad, Hercules, USA
Entwicklermaschine	X-OMAT; Kodak, USA
Feinwaage	Sartorius; Schumann GmbH, Sillerup
Flockeneisbereiter	AF100; Scotsman®
Gegenstromsterilbank	Nuaire, Plymouth
Geltrockner	BioRad, München
Glaswaren	Schott; Braun, Kronberg
Inkubationsschrank	B6120, Heraeus
Kryogefäß	Nalgene, USA
Kühl- und Gefriergeräte	Liebherr GmbH und Privileg, Quelle
LightCycler® 480II	Roche, Mannheim
Luminometer	Microplate Luminometer OrionII; Berthold Detection Systems, USA
Magnetrührer	MR3000; Heidolph
Mikroskop	Axiovert25; Zeiss, Jena
Mikrowelle	Panasonic
Nanodrop für RNA-Messungen	ND-1000; PeqLab, Erlangen

Native PAGE-Apparatur für EMSA	TV21; CTI GmbH
PAGE-Apparatur	Mini-Protean; BioRad, München
PCR-Geräte	DNA Engine; BioRad, München
pH-Meter	763 Multi Calimolic; Knick, Berlin
Photometer	BioPhotometer; Eppendorf, Köln
Pipetten	Gilson, USA und Eppendorf, Köln
Röntgenfilmentwicklermaschine	TYPON Optimax; Raymed Imaging AG
Rotationsmikrotom	Leica, Wetzlar
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Schüttler	Polymax1040 und Reax2; Heidolph
Spannungsquelle	PowerPack300X; BioRad, München
Stereomikroskop	Nikon, Tokio
Szintillationszähler	QC 4000 xER; Bioscan
Thermoschüttler	Thermomixer compact; Eppendorf, Köln
Transferkammer	Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell; BioRad, München
Ultraschallgerät	Sonifikator 250; Branson, Dietzenbach
Umluft-Sterilbank	HeraSafe KS12; Heraeus
UV-Transilluminator	Transilluminator TL33; Herolab GmbH
Vakuumpumpe	VACUMAT 120; Bachofer
Waage	PJ3000; Mettler
Wasserbäder	Sub6; Grant
Zellzahl-Messgerät	CASY TTC; Innovatis, Uetikon
Zentrifugen	Rotina 38R; Hettich, Tuttlingen Micro 200R; Hettich, Tuttlingen Sigma 2-5 Plattenzentrifuge; Sigma

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Bezugsquelle
Agarose	Crystal, Biolab
Blotting-Papier	Whatman 0,34 mm, 1,2 mm; Schleicher & Schuell GmbH
Einwegpipetten, steril	5 ml, 10 ml, 25 ml; Corning Incorporated

Elektroporationsküvetten (0,4 cm Elektrode)	Gene Pulser Küvette; Biorad, Hercules, USA
Kanülen, steril für Injektionen	0,4 x 20 mm, 27G x 3/42''; Braun, Kronberg
Kryoröhrchen	Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden Greiner Labortechnik Bio-One GmbH
Küvetten	Uvette 220-1600nm; Eppendorf, Köln Brand, Wertheim
Luciferase-Mikrotiterplatte	Lumitrac 200; USA Scientific
Multiwellplatten	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96; Roche
Nitrozellulose Membranen	Hybond-P; Amersham Protran; Whatman, USA
Parafilm	Brand/Merz & Co.
Pipettenspitzen	Gilson, Eppendorf gestopft von ART® Molecular BioProducts
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml; Eppendorf, Köln 15 ml, 50 ml; Falcon BD Biosciences PCR-Gefäße; Biozym Diagnostik GmbH
Röntgenfilme	Biomax MS Film; Kodak, USA Medical X-Ray screen film blue sensitive; CEA
Rundbodenröhrchen für Durchflusszytometrie	5 ml, und mit integriertem Sieb (35 µm); BD Biosciences
Säulen für DNA-Aufreinigung	Sephadex® G50 Säule; Amersham Bioscience
Sterilfilter 0,2 µm	Vakuumfiltrationseinheit; VWR, Darmstadt
Zellkulturschalen, -platten und -flaschen	Nunc GmbH & Co KG, Falcon BD Biosciences, Heidelberg
Zellsiebe 70 µm, 100 µm	Falcon BD Biosciences, Heidelberg

### 2.1.3 Enzyme, Reagenzien

Reagenz	Bezugsquelle
Ampicillin (Endkonzentration: 1 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Kollagenase aus <i>Clostridium histolyticum</i> Typ IA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DispaseII ( <i>neutral protease grade</i> ) aus	Roche, Mannheim

<i>Bacillus polymyxa</i>	
DTT	Dithiothreitol, Invitrogen, Eggenstein
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas, St. Leon-Rot
FirePol DNA-Polymerase	Solis BioDyne, Tartu
Kanamycin (Endkonzentration: 0,5 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LongAmp® Taq DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
Propidium-Iodid	Applichem
Restriktionsendonukleasen und zugehörige Puffer	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim MBI Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs, Frankfurt
RNAse	Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes, Keilaranta
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
SuperScript Reverse Transkriptase	Invitrogen, Eggenstein
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Eggenstein

## 2.1.4 Western-Blot-Antikörper

Antikörper	Größe	Spezies	Ver- dünnung	Lösung	Bezugsquelle
Anti-β-Aktin, monoklonal, Klon AC-74	43 kDa	Maus	1:10.000	Milch	Sigma
Anti-β-Tubulin, monoklonal, Klon 5H1	55 kDa	Maus	1:1.000	Milch	BD Pharmingen
Anti-Flag M2, monoklonal, Klon F3165	Protein +5 kDa	Maus	1:10.000	Milch	Sigma
Anti-Sercal (adult), monoklonal, Klon IIH11	110 kDa	Maus	1:1.000	Milch	Sigma
Anti-Sercal (embryonal), monoklonal, Klon VE121G9	110 kDa	Maus	1:1.000	Milch	Thermo Scientific
Anti-Pan-Ebf, monoklonal, Klon 5E6-111, Isotyp IgG2a	64 kDa	Ratte	1:2	Milch	E. Kremmer, HMGU
Anti-Maus-IgG-HRP		Ziege	1:5.000	Milch	Sigma-Aldrich



(Fc-spec.), polyklonal					
Anti-Ratte-IgG + IgMHRP, polyklonal		Ziege	1:5.000	Milch	Jackson Immuno Research

## 2.1.5 Reagenzien der Zellkultur

Name	Besonderheiten, Konzentration	Hersteller
Medien		
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium mit Glutamax	Gibco BRL Paisley, Schottland
DMEM für ES-Zellen	ohne Glutamax	Gibco BRL Paisley, Schottland
MEMalpha	Minimum Essential Medium	Gibco BRL Paisley, Schottland
RPMI 1640	Medium entwickelt am Roswell Park Memorial Institut	Gibco BRL Paisley, Schottland

Zusätze für Medien		
FKS	Fötales Kälberserum, inaktiviert	PAA, Österreich
FKS für ES-Zellen	FKS ES-Zell getestet	PAA, Österreich
Pferdeserum	inaktiviert	PAA, Österreich
Hühnerserum	inaktiviert	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin	200 mM	Gibco BRL Paisley, Schottland
Pen/Strep	Penicillin, 10.000 Units/ml Streptomycin, 10.000 µg/ml	Gibco BRL Paisley, Schottland
Natrium Pyruvat	100 mM	Gibco BRL Paisley, Schottland
β-ME	2-β-Mercaptoethanol, 99 %	Sigma, Taufkirchen
β-ME für ES-Zellen	2-β-Mercaptoethanol, 50 mM	Gibco BRL Paisley, Schottland
MEM NEAA	nicht essentielle Aminosäuren, 100x	Gibco BRL Paisley, Schottland
HEPES	4 (2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin- Ethansulfonsäure, 1 M	Invitrogen, Eggenstein
LIF	Leukämie inhibierender Faktor, 10.000.000 U/ml	ESGRO®, Millipore, USA
Ciprobay®400		Bayer, Leverkusen

Ascorbinsäure		Sigma, Taufkirchen
β-Glycerophosphat		Calbiochem, Darmstadt
Mitomycin C		Sigma, Taufkirchen
Geneticin	G418-Sulfat	Gibco BRL Paisley, Schottland

Transfektions-Reagenzien und Medien		
Lipofectamine 2000		Invitrogen, Eggenstein
PEI	Polyethylenimin	Sigma, Taufkirchen
OptiMEM	Modifikation des Eagle's Minimum Medium	Invitrogen, Eggenstein
RPMI 1640 für ES-Zellen	ohne Phenolrot	PAA, Österreich

Sonstige		
DPBS	Steriles PBS	Gibco BRL Paisley, Schottland
DMSO	Dimethylsulfoxid	Fluka, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	proteolytisches Enzym	Gibco BRL Paisley, Schottland

### 2.1.6 Längenstandards

Längenstandard	Bezugsquelle
100 bp und 1 kb Plus DNA Ladder	GeneRuler™, Fermentas, St. Leon-Rot
1 kb Ladder (DNA) für Southern Blot	Invitrogen, Eggenstein
RiboRuler High Range (RNA)	Fermentas, St. Leon-Rot
Prestained SDS-PAGE Standard	PageRuler™, Fermentas, St. Leon-Rot

### 2.1.7 Kits

Kit	Bezugsquelle
BCA Protein Assay Reagent	Pierce, Thermo Scientific
CloneJET PCR Cloning Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
QIAprep Midiprep Kit und Maxiprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Quick Change®, Site-Directed Mutagenesis	Stratagene, USA
Random Prime Labeling Kit	Amersham Bioscience, Freiburg
SuperScript II RT	Invitrogen, Eggenstein
TnT®-coupled Reticulocyte Lysate Systems	Promega, Mannheim

## 2.1.8 Plasmide

### 2.1.8.1 Plasmide eingesetzt in Reporter Assays

Vektor	Insert	Prokaryotische Resistenz	Hersteller oder Herkunft
pCMVcyto	---	Ampicillin	Invitrogen
pCMVcyto-Ebf1	<i>Ebf1</i>	Ampicillin	Dr. S. Hiechinger, HMGU
pCMVcyto-Ebf2	<i>Ebf2</i>	Ampicillin	Dr. S. Hiechinger, HMGU
pCMVcyto-Ebf3	<i>Ebf3</i>	Ampicillin	wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert
pCMVcyto- Ebf4	<i>Ebf4</i>	Ampicillin	wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert
pBLluc5	---	Ampicillin	Dr. U. Zimmer-Strobl, HMGU
pBLluc5-λ5-promotor <sup>1</sup>	<i>Lambda 5 pr.</i> -299 bis +131	Ampicillin	Prof. Dr. M. Sigvardsson, Linköpings Universität
pBLluc5-Ang-promotor 1	<i>Angiogenin pr.</i> -935 bis +35	Ampicillin	wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert
pGL3-basic	---	Ampicillin	Prof. Dr. M. Sigvardsson, Linköpings Universität
pGL3-FoxO1-promotor <sup>2</sup>	<i>Forkhead box O1 pr.</i> -560 ( <i>SmaI</i> )	Ampicillin	Prof. Dr. M. Sigvardsson, Linköpings Universität
pGL3-OcaB-promotor <sup>2</sup>	<i>Pou2af1 pr.</i> -499 ( <i>SmaI</i> )	Ampicillin	Prof. Dr. M. Sigvardsson, Linköpings Universität
pGL3-B29-promotor <sup>3</sup>	<i>CD79b</i>	Ampicillin	Prof. Dr. M. Sigvardsson,

---

<sup>1</sup> Sigvardsson *et al.*, 1997

<sup>2</sup> Zandi *et al.*, 2008

<sup>3</sup> Akerblad *et al.*, 1999

	<i>BglIII + SacI</i>		Linköpings Universität
pGL3-Mb-1-promotor <sup>4</sup>	<i>Membrane bound-1 pr.; SmaI</i>	Ampicillin	Prof. Dr. M. Sigvardsson, Linköpings Universität
pGL3-Opg-promotor <sup>5</sup>	<i>Osteoprotegerin pr. -704 bis +44 (NhaI + ApaI)</i>	Ampicillin	Dr. R. Grosschedl, MPI für Immunbiologie, Freiburg
pGL3-AcIII-promotor <sup>6</sup>	<i>Adenylyl cyclase 3 pr. -1,05 kb (EcoRI + BamHI)</i>	Ampicillin	Prof. Dr. R. Reed, Johns Hopkins Universität, Baltimore
pBLluc5-Atp2a1-promotor	<i>Atp2a1 pr. -1114 bis +35</i>	Ampicillin	Dr. P. Kopp, HMGU
pCMV-lacZ	<i>lacZ</i>	Ampicillin	Dr. U. Zimmer-Strobl, HMGU

PCMVcyto-basierte Plasmide besitzen einen CMV-Promotor und dienen als Aktivatorplasmid. PBLuc5- und pGL3- basierte Plasmide tragen das Luziferase-Gen (*firefly-luciferase*) und wurden als Reporterplasmid genutzt.

Das pCMV-LacZ-Plasmid trägt das für die  $\beta$ -Galaktosidase kodierende Gen *LacZ* und wurde parallel in die Zellen transfiziert, um eine Normalisierung der Messwerte in Luziferase-Reporter-Assays zu ermöglichen.

### 2.1.8.2 Plasmide der ES-Zellkultur

Vektor	Insert	Prokaryotische Resistenz	Hersteller oder Herkunft
pEZ-frt-loxD <sup>T</sup>	---	Ampicillin, Neomycin	Dr. M. Schmidt-Supprian, MPI für Biochemie, Martinsried; ursprünglich von Prof. Dr. Klaus Rajewsky
pEZ-frt-loxD <sup>T</sup> -Ebf4-target	gDNA von <i>Ebf4</i>	Ampicillin, Neomycin	wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert

<sup>4</sup> Sigvardsson *et al.*, 2002

<sup>5</sup> Kieslinger *et al.*, 2005

<sup>6</sup> Wang *et al.*, 1997

pJet	---	Ampicillin	CloneJet-Kit
pJet-Sonde-5'	533 bp gDNA von <i>Ebf4</i>	Ampicillin	wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert
pJet-Sonde-3'	190 bp gDNA von <i>Ebf4</i>	Ampicillin	wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert

Das Ausgangs-Plasmid (pEZ-frt-loxDT) der konditionalen Deletion von *Ebf4* kodiert für die beiden *loxP*-Sequenzen sowie eine von zwei *frt*-Sequenzen flankierte *Neomycin*-Resistenz-Kassette zur Selektion der Klone. Die Anwesenheit des letalen Diphteriatoxins dient der Abtötung von ES-Zell-Klonen, welche das Plasmid zufällig in das Genom integriert haben, wodurch die Ausbeute an potentiell korrekten Klonen erhöht wird.

Zur PCR-basierten Klonierung des pEZ-frt-loxDT-*Ebf4*-target-Plasmids wurde ein BAC-Klon (RP23-96j5, RPCIB731J0596Q; ImaGenes) als Grundlage der genomischen DNA (gDNA) verwendet.

### 2.1.8.3 Plasmide verwendet für *in situ* Hybridisierungen

Vektor	Insert	Prokaryotische Resistenz	Hersteller oder Herkunft
pBS II-KS(+)	---	Ampicillin	Fermentas
pBS II-KS(+)- <i>Ebf4</i> - <i>antisense</i> ISH1	1006 bp gDNA <i>XbaI</i> + <i>SacI</i>	Ampicillin	wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert
pBS II-KS(+)- <i>Ebf4</i> - <i>sense</i> ISH1	1006 bp gDNA <i>SacI</i> + <i>XbaI</i>	Ampicillin	wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert
pCR-II-Topo	---	Ampicillin	Invitrogen
pCR-II-T- <i>Ebf4</i> ISH2	797 bp gDNA von <i>Ebf4</i>	Ampicillin	wurde im Rahmen dieser Arbeit gemeinsam mit F. Giesert kloniert

### 2.1.8.4 Sonstige Plasmide

Vektor	Insert	Prokaryotische Resistenz	Hersteller oder Herkunft
pcDNA3.1-Flag	---	Ampicillin	Dr. H. Silje, MPI München
pcDNA3.1- <i>Ebf1</i> -Flag	<i>Ebf1</i>	Ampicillin	Dr. S. Jin, HMGU

pcDNA3.1-Ebf2-Flag	<i>Ebf2</i>	Ampicillin	Dr. S. Jin, HMGU
pcDNA3.1-Ebf3-Flag	<i>Ebf3</i>	Ampicillin	Dr. S. Jin, HMGU
pcDNA3.1-Ebf4-Flag	<i>Ebf4</i>	Ampicillin	Dr. S. Jin, HMGU

Die pcDNA-Flag-Plasmide tragen einen N-terminalen *Flag-Tag* vor der jeweils prädominanten Form des *Ebf1*, *Ebf2*, *Ebf3* oder *Ebf4*.

## 2.1.9 Sonden für Southern Blot-Analysen

### 5'-Sonde

Die 533 bp Sonde wurde aus dem Plasmid pJet-Sonde-5' mit den Enzymen *XhoI* und *XbaI* linearisiert.

Waschbedingungen nach Hybridisierung: 2 x 9 min bei 58° C in 0,2 x SSC 0,5 % SDS.

### 3'-Sonde

Linearisierung aus dem Plasmid pJet-Sonde-3' mit den Enzymen *XhoI* und *XbaI* (190 bp).

Waschbedingungen nach Hybridisierung: 3 x 10 min bei 58° C in 0,2 x SSC 0,5 % SDS.

## 2.1.10 Oligonukleotide

### 2.1.10.1 Oligonukleotide zur quantitativen Real-Time PCR-Analyse

Sämtliche Primer-Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried) bezogen. Die Abkürzungen fwd (*forward*) und rev (*reverse*) geben jeweils die Orientierung des Primers an. In quantitativen Real-Time PCR -Analysen wurde ggf. die Effizienz des Primerpaares ermittelt und in die Kalkulation eingerechnet.

Name	Sequenz 5' → 3'	Amplifikationsprodukt [bp]; Effizienzfaktor
Referenzgene		
<i>β-Aktin</i> fwd	TGT GGT GGT GAA GCT GTA GC	380 bp; 1,959
<i>β-Aktin</i> rev	GAC GAC ATG GAG AAG ATC TGG	
<i>Hprt</i> fwd	TGC TGG TGA AAA GGA CCT CTC G	310 bp; 1,887
<i>Hprt</i> rev	TCT GGG GAC GCA GCA ACT GA	
<i>Pbgd</i> fwd	CAG TGA TGA AAG ATG GGC AAC	100 bp; 1,951
<i>Pbgd</i> rev	AAC AGG GAC CTG GAT GGT G	

Ebf-Gene		
<i>Ebf1</i> fwd	CAT GTC CTG GCA GTC TCT GA	240 bp; 1,993
<i>Ebf1</i> rev	CAA CTC ACT CCA GAC CAG CA	
<i>Ebf2</i> fwd	TGG AGA ATG ACA AAG AGC AAG	337 bp; 1,954
<i>Ebf2</i> rev	GGG TTT CCC GCT GTT TTC AAA	
<i>Ebf3</i> fwd	AGA GCC GAA CAA CGA GAA AA	163 bp; 1,967
<i>Ebf3</i> rev	GCA CAT CTC CGG ATT CTT GT	
<i>Ebf4</i> fwd	TTG ACT CCA TGT CGA AGC AG	203 bp; 2,0
<i>Ebf4</i> rev	GCA GTT CTG GTT GCA TTT GA	
<i>Ebf4/11</i> fwd	ACC TCA CCT TTC GCC ATC AT	250 bp
<i>Ebf4/11</i> rev	CCT GCC TGT TCT CTG GGT GT	
<i>Ebf4/132</i> fwd	CCT GGT GTG ACT GGC CTT G	165 bp
<i>Ebf4/132</i> rev	CAA AAG GCT GGT CTG GAA GC	
<i>Ebf4/14</i> fwd	CAG AGC AGC TAT GGC AGT GG	110/180 bp
<i>Ebf4/14</i> rev	AAG GAG AAG ACG CTG GTG GT	
<i>Ebf4/S</i> fwd	TAA CCA GGT ATG GCG CCT CT	110/180 bp
<i>Ebf4/S</i> rev	CTC CTG CGA AGA CAA GAA CG	
<i>Ebf4/Prädominant</i> fwd	GTC AAC ATG ATC TGC GCT GT	180 bp
<i>Ebf4/Prädominant</i> rev	AGT ATG CCA AGC CCT GGA GT	

Muskel-Gene		
<i>Atp2a1</i> fwd	ACA CAG ACC CTG TCC CTG AC	182 bp
<i>Atp2a1</i> rev	TGC AGT GGA GTC TTG TCC TG	
<i>Myf5</i> fwd	TGA GGG AAC AGG TGG AGA AC	285 bp
<i>Myf5</i> rev	TGG AGA GAG GGA AGC TGT GT	
<i>MyoD</i> fwd	GAC AGG GAG GAG GGG TAG AG	215 bp
<i>MyoD</i> rev	TGC TGT CTC AAA GGA GCA GA	
<i>Myogenin (MyoG)</i> fwd	TTA CGT CCA TCG TGG ACA GC	248 bp
<i>Myogenin (MyoG)</i> rev	TGG GCT GGG TGT TAG TCT TA	

<i>Myf6 (Mrf4) fwd</i>	AGA TCG TCG GAA AGC AGC	304 bp
<i>Myf6 (Mrf4) rev</i>	CCT GGA ATG ATC CGA AAC AC	
<i>Desmin fwd</i>	GAC TCC CTG ATG AGG CAG ATG AGG	320 bp
<i>Desmin rev</i>	CCT CGC TGA CAA CCT CTC CAT CCC	
<i>Atp2a 1a+1b fwd</i>	TTC CTC ATC CTC TAT GTC GAC C	215 + 211 bp
<i>Atp2a 1a+1b rev</i>	CTG AAG ATG CAT GGC TAT TGG	
<i>Atp2a 2a fwd</i>	TGA TCC TCA TGG ATG AGA CG	215 bp
<i>Atp2a 2a rev</i>	CCA CAT CAC ACA GTG AGT TGG	
<i>Atp2a 2b fwd</i>	TGA TCC TCA TGG ATG AGA CG	211 bp
<i>Atp2a 2b rev</i>	AGT CAA GAC CAG AAC ATA TCG C	
<i>Atp2a 1+2 fwd</i>	GAC GAG TTT GGG GAG CAG CT	192 bp
<i>Atp2a 1+2 rev</i>	AGG TGG TGA TGA CAG CAG G	
<i>Atp2a 2 fwd</i>	TGC CTG GTG GAG AAG ATG AAT G	213 bp
<i>Atp2a 2+3 rev</i>	CCC TTC ACA AAC ATC TTG C	
<i>Atp2a 3 fwd</i>	TGC CTG GTA GAG AAG ATG AAT G	213 bp
<i>Sarcolipin fwd</i>	GTC CTT CTG GAG TTC TCA TCC	250 bp
<i>Sarcolipin rev</i>	GTC AGG CAT TGT GAG TGT GG	
<i>Phospholamban fwd</i>	TGC CTT CCT GGC ATA ATG G	204 bp
<i>Phospholamban rev</i>	ATG TTG CAG GTC TGG AGT GG	

### 2.1.10.2 Oligonukleotide für Klonierungen

Zusätzlich eingefügte Schnittstellen wurden nachfolgend kursiv dargestellt.

Name	Sequenz 5' → 3'	Schnittstelle	Produkt [bp]
<i>In situ</i> Hybridisierung			
ISH1 <i>Ebf4</i> fwd	GCA GTA ACG <i>AGC TCC</i> TCC TGA A	<i>SacI</i> (GAGCTC)	1006 bp
ISH1 <i>Ebf4</i> rev	CAG GGC CTC <i>TCT AGA</i> TGA CCT CT	<i>XbaI</i> (TCTAGA)	
ISH2 <i>Ebf4</i> fwd	CAG GGC TTG GCA TAC TCC TA		797 bp
ISH2 <i>Ebf4</i> rev	GCC ACC TGC ATC TGG TTT TA		



Luziferase- und $\beta$ -Galaktosidase-Tests			
<i>Ebf4</i> Luc fwd	GTC GAC ATG TTC CCC GCA CAG GAC	<i>Sall</i> (GTCGAC)	1800 bp
<i>Ebf4</i> Luc rev	CTC GAG TTA GGA GTA TGC CAA GC	<i>XhoI</i> (CTCGAG)	
<i>Ebf3</i> Luc fwd	GTC GAC ATG TTT GGG ATT CAG GAG AA	<i>Sall</i> (GTCGAC)	1656 bp
<i>Ebf3</i> Luc rev	CTC GAG TCA CAT GGG CGG GAC	<i>XhoI</i> (CTCGAG)	
<i>Anglpr.1</i> fwd	AAG CTT TCG TTG GTC TAG GGG TAT GAT TCT CGC TTT	<i>HindIII</i> (AAGCTT)	970 bp
<i>Anglpr.1</i> rev	GGA TCC CAC TCC TTC CTT CCT GTT GG	<i>BamHI</i> (GGATCC)	

<i>Ebf4</i> -konditionale Deletion (CKO)			
<i>Ebf4</i> cko LHA fwd	GCG GCC GCG GGT TTC TCT CGC TTT GTA G	<i>NotI</i> (GCGGCCGC)	6350 bp
<i>Ebf4</i> cko LHA rev	GCG GCC GCA GTA CTC TAG CTG CTT AGG TGG AGG	<i>NotI</i> (GCGGCCGC)	
<i>Ebf4</i> cko target fwd	GTC GAC GCT TCA GGT TCC TGC CTT GC	<i>Sall</i> (GTCGAC)	1643 bp
<i>Ebf4</i> cko target rev	GTC GAC CGG GCT C AC AGC AAC TCT AC	<i>Sall</i> (GTCGAC)	
<i>Ebf4</i> cko RHA fwd	CTC GAG GGT ACC GTG ATG CTG ATC CTC TGC TG	<i>XhoI</i> (CTCGAG)	3605 bp
<i>Ebf4</i> cko RHA rev	CTC GAG TGC CCT ATA TAC TCT TGC TAC	<i>XhoI</i> (CTCGAG)	
Sonde 5' fwd	CTG TGG CTG TGC ACT GTG G		545 bp
Sonde 5' rev	ACC CGG GAG AAG AGG AAG G		
Sonde 3' fwd	GGA TTA AAG GCA TGC TTC ATC ACT		186 bp
Sonde 3' rev	AGG TAC CTT ATC TTG AGT TCC TTG TCT		

### 2.1.10.3 Oligonukleotide zur Maus-Genotypisierung

In eine PCR-Reaktion wurden in der Regel drei Primer (einmal fwd und zwei für die jeweiligen Allele (Wt/Ko) spezifische rev Primer) eingesetzt.

Name	Sequenz 5'→3'	Produkt [bp]
<i>Ebf1</i> fwd	GGA AAA GTT GCC TTG AAG TTG	150 bp 400 bp
<i>Ebf1</i> wt rev	TGT AGA GGA GCT GGA GCC G	
<i>Ebf1-neo</i> rev	GCG ATG CCT GCT TGC CGA A	
<i>Ebf2</i> fwd	GGC CTG GGT TGT AGT AAC CAT	380 bp 600 bp
<i>Ebf2</i> wt rev	TTC AGA GCT GGT CCT CTT CC	
<i>Ebf2-gfp</i> rev	CTG AGC ATG ATC TTC CAT CAC	
<i>Ebf3</i> fwd	GGG CAC ACC ACA GTC TGT GTC	300 bp 500 bp
<i>Ebf3</i> wt rev	GGA GGA TAT ACA GGG TCA CAC	
<i>Ebf3-lacZ</i> rev	GCG CCG GTC ACC ATT ACC	
<i>Ebf4</i> fwd	TGA CAG GGA GGT ATG GAG TGG	512 bp 329 bp 470 bp
<i>Ebf4</i> wt rev	GGT CCC ACC CCA AGA AAG AT	
<i>Ebf4-flox</i> rev	AAT TCA CTG GCC GTC GTT TT	
<i>Ebf4-nach flp</i> rev	ACC TTG CAG CCA TCT GTG AA	

Genotypisierungs-PCR-Programme:

<b><i>Ebf1</i>-Genotypisierung</b>		
Denaturierung	80° C	3 min
Zyklische Denaturierung	95° C	30 sec
Zyklische Anlagerung	58° C	30 sec
Zyklische Elongation	72° C	30 sec
30 Zyklen		
Finale Elongation	72° C	10 min
Abkühlen	4° C	

<b><i>Ebf2</i>-Genotypisierung</b>		
Denaturierung	94° C	4 min
Zyklische Denaturierung	94° C	30 sec
Zyklische Anlagerung	62° C	30 sec
Zyklische Elongation	72° C	1 min
35 Zyklen		
Finale Elongation	72° C	10 min
Abkühlen	4° C	

<b><i>Ebf3</i>-Genotypisierung</b>		
Denaturierung	94° C	2 min
Zyklische Denaturierung	94° C	30 sec

<b><i>Ebf4</i>-Genotypisierung</b>		
Denaturierung	94° C	3 min
Zyklische Denaturierung	94° C	15 sec

Zyklische Anlagerung	61° C	1 min	Zyklische Anlagerung	58° C	30 sec
Zyklische Elongation	72° C	30 sec	Zyklische Elongation	72° C	40 sec
35 Zyklen			35 Zyklen		
Finale Elongation	72° C	10 min	Finale Elongation	72° C	10 min
Abkühlen	4° C		Abkühlen	4° C	

#### 2.1.10.4 Oligonukleotide zur punktgerichteten Mutagenese des *Atp2a1*-Promotors

Das innere Palindrom der potentiellen Ebf-Bindestelle wurde nachfolgend unterstrichen und die durchgeführten Basen-Mutationen mit kleinen Buchstaben gekennzeichnet.

Name	Sequenz 5' → 3'	Mutation 5' → 3'
M1 fwd	GCT TCA TCC AGC <u>CTC AGc cGT</u> CCT GCT CTC AG	CTCAGGGG → CTCAG <u>CCG</u>
M1 rev	CTG AGA GCA GGA <u>Cgg CTG AGG</u> CTG GAT GAA GC	
M2 fwd	TGG AAA GAT CTG <u>CTC AGc cGT</u> GGG CTT GGA ACT G	CTCAGGGG → CTCAG <u>CCG</u>
M2 rev	CAG TTC CAA GCC CAC <u>ggC TGA</u> GCA GAT CTT TCC A	
E1 fwd	GGG GGT CAC CAT GAA <u>Gaa tTA GGG</u> TTG AAG GCT AGT G	CCCTAGGG → <u>AATTAGGG</u>
E1 rev	CAC TAG CCT TCA <u>ACC CTA att</u> CTT CAT GGT GAC CCC C	
E2 fwd	GGC TGC AGC AAC CCC <u>Taa tTA GGG</u> TAA GGT TAC CAT CTG	CCCTAGGG → <u>AATTAGGG</u>
E2 rev	CAG ATG GTA ACC TTA <u>CCC TAa ttA</u> GGG GTT GCT GCA GCC	

Mutagenese an „M“- Bindestellen: nach Zhao *et al.*, 2006.

Mutagenese an „E“-Bindestellen: nach Travis *et al.*, 1993.

### 2.1.10.5 Oligonukleotide zur Gelretardierung

Markierungen und Mutationen wurden wie in 2.1.10.4 durchgeführt.

Name	Sequenz 5' → 3'	Produkt [bp]
<i>Mb-1</i> fwd	CCC CGA CCC CAC GCA CTA GAG AGA GAC TCA AGG <u>GAA</u> TTG TGG	59 bp
<i>Mb-1</i> rev	CCC TGC ACC TGG GCT GGC CAC AAT <u>TCC CTT GAG</u> TCT CTC TC	
<i>Atp2a1</i> M1 fwd	GAT GGC TGC CAT CCA GCC <u>TCA GGG</u> <u>GTC</u> CTG CTC	44 bp
<i>Atp2a1</i> M1 rev	CAG TGC AGA TGG AGC AGG <u>ACC CCT</u> <u>GAG</u> GCT GGA TG	
<i>Atp2a1</i> M1 mutiert fwd	GAT GGC TGC CAT CCA GCC <u>TCA Gcc</u> <u>GTC</u> CTG CTC	44 bp
<i>Atp2a1</i> M1 mutiert rev	CAG TGC AGA TGG AGC AGG <u>ACg gCT</u> <u>GAG</u> GCT GGA TG	
<i>Atp2a1</i> E1 fwd	GAT GGC TGC CCA TGA AGC <u>CCT AGG</u> <u>GTT</u> GAA GG	56 bp
<i>Atp2a1</i> E1 rev	CAG TGC AGA TGC CTT CAA <u>CCC TAG</u> <u>GGC</u> TTC ATG G	
<i>Atp2a1</i> E1 mutiert fwd	GAT GGC TGC CCA TGA AGa <u>atT AGG</u> <u>GTT</u> GAA GG	56 bp
<i>Atp2a1</i> E1 mutiert rev	CAG TGC AGA TGC CTT CAA <u>CCC TAa ttC</u> TTC ATG G	
<i>Atp2a1</i> E2 fwd	GAT GGC TGC GCA GCA ACC CCT <u>CCC</u> <u>TAG GGT</u> AAG GTT AC	52 bp
<i>Atp2a1</i> E2 rev	CAG TGC AGA TGG TAA CCT TAC <u>CCT</u> <u>AGG GAG</u> GGG TTG CTG C	
<i>Atp2a1</i> E2 mutiert fwd	GAT GGC TGC GCA GCA ACC CCT <u>aat</u> <u>TAG GGT</u> AAG GTT AC	52 bp
<i>Atp2a1</i> E2 mutiert rev	CAG TGC AGA TGG TAA CCT TAC <u>CCT</u> <u>Aat tAG</u> GGG TTG CTG C	

### 2.1.10.6 Oligonukleotide für sonstige PCRs

Name	Sequenz 5' → 3'	Produktlänge
<i>Ebf4</i> Exon_1 fwd	ATG TTC CCC GCA CAG GAC	593 bp
<i>Ebf4</i> Exon_4 fwd	TCG GAC AGA GCA AGA CCT CTA C	231 bp
<i>Ebf4</i> Exon_7 rev	TTC TGG TTG CAT TTG AGA AAG A	
Mykoplasmen fwd	TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT	800 bp
Mykoplasmen rev	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT	
<i>Longrange</i> -PCR fwd	CGC GGA TCC ATA ACT TCG TA	<i>flox</i> : 3,2 kb
<i>Longrange</i> -PCR rev	ACC TTG CAG CCA TCT GTG AA	<i>fl nach flp</i> : 1,9 kb

### 2.1.11 Bakterien

#### XL-1blue

*Escherichia coli*-Stamm

Genotyp: F':Tu10 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, *endA1*, *gyrA96* (Nal<sup>R</sup>), *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gluV44*, *lacIZΔM15*, Tn10 (Tet), M15, *hsdR17* (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>).

Der Original-Bakterienstamm wurde von der Firma Stratagene bezogen.

#### DH5α

*Escherichia coli*-Stamm

Genotyp: F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80dlacZΔM15, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *supE44λ*, *hsdR17* (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>-</sup>).

Der Original-Bakterienstamm wurde von der Firma Stratagene bezogen.

### 2.1.12 Zelllinien

#### 18-81 TK+

Murine, aus Knochenmark isolierte, prä-B-Zelllinie der 18-81-Linie, welche  $\mu$ H-Ketten-positiv ist und *Ebfl* exprimiert (Siden *et al.*, 1979). Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Hans-Martin Jäck, Molekulare Immunologie, Universität Erlangen.

#### 2018

Immortalisierte murine adhärente Stroma-Zelllinie, gewonnen aus fötaler Leber, ohne stammzellunterstützende Fähigkeit (Wineman *et al.*, 1996). Zur Verfügung gestellt von Dr. Kateri Moore, Princeton University.

### **70Z/3**

Murine prä-B-Zelllinie (Paige *et al.*, 1978), zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Dirk Eick, HMGU München.

### **AFT024**

Immortalisierte, aus fötaler Leber gewonnene, murine adhärente Stroma-Zelllinie mit stammzellunterstützender Fähigkeit (Moore *et al.*, 1997). Zur Verfügung gestellt von Dr. Kateri Moore, Princeton University.

### **Ba/F3**

IL3-abhängige, aus murinem Knochenmark gewonnene pro-B-Zelllinie (Palacios *et al.*, 1984). Zur Verfügung gestellt von Dr. Rudolf Grosschedl, MPI für Immunbiologie, Freiburg.

### **C2C12**

Murine prämyoblastische adhärente Vorläuferzelllinie (Yaffe und Saxel, 1977). Zur Verfügung gestellt von Dr. Rudolf Grosschedl, MPI für Immunbiologie, Freiburg.

### **CH3T10½**

Murine mesenchymale Osteoblasten-ähnliche adhärente Zelllinie (Taylor und Jones, 1997). Zur Verfügung gestellt von Dr. Rudolf Grosschedl, MPI für Immunbiologie, Freiburg.

### **GP+E86**

Murine, Fibroblasten-ähnliche, retrovirus-verpackende adhärente Zelllinie, welche aus Mausembryonen gewonnen wurde (Markowitz *et al.*, 1988). Diese Zelllinie wird in der Regel zur Infektion muriner Zellen verwendet, da sie aufgrund der in ihr enthaltenen *Gag*-, *Pol*- und *Env*-Gene des *Moloney murine leukemia*-Virus Helfer-freie rekombinante Retroviren herstellen kann. Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Stefan Bohlander, Klinikum der Universität München-Großhadern.

### **HEK293T**

Transformierte, Fibroblasten-ähnliche, adhärente Zelllinie, welche aus humanen embryonalen Nieren-Epithelzellen (Graham *et al.*, 1977) gewonnen wurde. Die Zelllinie exprimiert konstitutiv das *SV40 large T antigen*. Zur Verfügung gestellt von Dr. Rudolf Grosschedl, MPI für Immunbiologie, Freiburg.

### **HeLa**

Transformierte, Epithelzellen-ähnliche, adhärente Zelllinie, welche aus einem humanen Zervixkarzinom gewonnen wurde (Scherer *et al.*, 1953). Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Bettina Kempkes, HMGU München.

### **MC3T3**

Murine, Osteoblasten-ähnliche, adhärente Zelllinie (Kodama *et al.*, 1981). Zur Verfügung gestellt von Dr. Rudolf Grosschedl, MPI für Immunbiologie, Freiburg.

### **WEHI-3B**

Murine, IL-3 produzierende, Makrophagen-ähnliche myelomonocytische adhärente Zelllinie. Der Überstand dieser Zelllinie wurde für die Kultivierung von Ba/F3 Zellen sterilfiltriert (Warner *et al.*, 1969). Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Stefan Bohlander, Klinikum der Universität München-Großhadern.

### **Embryonale Fibroblasten (EF-Zellen)**

EF-Zellen wurden aus Mäusen des Neomycin-resistenten Stammes pSV2neo, PEP-II4 (Dr. Ralf Kühn, HMGU München) präpariert (siehe 2.2.3.4.1).

### **IDG3.2**

F1 Embryonale Stammzellen (ES-Zellen, C57BL/6J x 129S6). Zur Verfügung gestellt von Dr. Ralf Kühn, HMGU München. Nach Hitz *et al.*, 2007 und persönlicher Kommunikation sind die ES-Zellen dieser Linie besonders robust bezüglich der Zellkulturbedingungen und ergeben gute Ergebnisse in der Keimbahntransmission.

### **Whitlock Witte**

Die Zellen wurden von Inga Ludenberg (HMGU München) in Anlehnung an Whitlock und Witte (1982) aus murinen Knochenmarkszellen von 4-24 Wochen alten Mäusen hergestellt. Dieses stromale „feeder-layer“ dient als Langzeit-B-Zell-Kultursystem.

## **2.1.13 Mausstämme**

Alle Mäuse wurden im Tierlabor (Sicherheitsstufe S1, GenTG) unter konventionellen oder SPF-(spezifiziert Pathogenfrei)-Bedingungen in einem 12 stündlichen Lichtzyklus gehalten.

Die Aufzucht, Haltung und Tötung der Mäuse sowie die tierexperimentellen Studien wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes (TierSchG) durchgeführt.

**C57BL/6J** (Jackson, Taconic, Charles River, WIGA)

Dieser Mausstamm wurde zur Verpaarung der transgenen Mäuse verwendet, um ein Wildtyp-Allel zu erhalten. Für Wildtyp-Analysen wurden ausschließlich C57BL/6J-Tiere verwendet.

### ***Ebf1*-Deletion**

Bei dieser konventionellen Deletion wurden die letzten 35 Basenpaare des dritten kodierenden Exons (*Bam*HI-Restriktionsschnittstelle) über homologe Rekombination mit einer *Neomycin*-Resistenz-Kassette ersetzt und damit das *Ebf1*-Gen inaktiviert. Zur Verfügung gestellt wurde diese Mauslinie von Dr. Rudolf Grosschedl, MPI für Immunbiologie, Freiburg (Lin & Grosschedl, 1995).

### ***Ebf2*-Gfp**

Durch das Ersetzen von 5 Exons, kodierend für die ersten 162 Aminosäuren, mit einer *tauEGFPpA*-Reporterkassette wurde der *Ebf2* Locus deletiert. Der Mausstamm wurde von Prof. Randall R. Reed, Johns Hopkins Universität, Baltimore USA, zur Verfügung gestellt (Wang *et al.*, 2004).

### ***Ebf3*-LacZ**

Der *Ebf3* Locus wurde deletiert, indem die ersten 4 Exons (*Pst*I) mit einer *NLS-lacZ*-Reporterkassette ersetzt wurden. Diese von Dr. Mario Garcia-Dominguez und Prof. Dr. Patrick Charnay generierte, bisher unveröffentlichte, Mauslinie wurde von Dr. Sonia Garel zur Verfügung gestellt, Institut der Biologie, Ecole Normale Supérieure, Paris.

### ***Ebf4*-CKO**

In dieser Arbeit wurde die konditionale Deletion des *Ebf4*-Gens entwickelt.

## **2.1.14 Puffer und Lösungen**

**DEPC-Wasser** (0,1 % DEPC (Sigma) wurde 8 h in destilliertem H<sub>2</sub>O gerührt und anschließend autoklaviert)

**EDTA** (für 0,5 M: 186,1 g/l EDTA, pH 8,2 (NaOH); autoklaviert)



**PBS** (0,2 g/l KCl, 0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 g/l NaCl, 1,43 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH 7,2 (HCl); autoklaviert)

**Sörens-Puffer** (für pH 7,4: 9,71 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,65 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.)

**SSC** (für 20x SSC: 175,32 g/l NaCl, 88,23 g/l Natriumzitat pH 7 (HCl))

**TBS** (für 10x TBS: 80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 30 g/l Tris-Base, pH 8 (HCl); autoklaviert)

**TBE** (für 10x TBE: 7,4 g/l EDTA, 55 g/l Borsäure, 108 g/l Tris-Base, pH 8,3 (NaOH); autoklaviert)

**TE** (10 mM Tris-Base, pH 8 (HCl), 1 mM EDTA; autoklaviert)

**TAE** (für 50x TAE: 243 g/l Tris-Base, 18,6 g/l EDTA, 20,5 g/l Natrium H<sub>2</sub>O-frei, 9 % Essigsäure, pH 8,7 (Essigsäure); autoklaviert)

## 2.1.15 Software

Programm	Hersteller
Analyse von DNA-Sequenzen und Klonierungssoftware	
4Peaks 1.7.2	mekentosj.com
ClustalW2	EMBL-EBI, England
DNA Strider 1.4f2	CEA, Frankreich
MacVector Klonierungs-Software	MacVector, USA
Primer3	Whitehead Institute for Biomedical Research
Sequenzierungs-Service	Eurofins MWG Operon, Ebersberg

Aufnahme- und Analyseprogramme von Durchflusszytometrie und RNA/DNA	
CELLQuestPro <sup>TM</sup>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACSDiva Software	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FlowJo 9.3	Treestar Inc., USA
Light Cycler® SYBR Green Software	Roche Diagnostics, Mannheim
Nanodrop ND-1000 Software	PeqLab, Erlangen

Computer-Software zur Kalkulation und Verarbeitung von Text, Bildern und Referenzen	
EndNote X4	Thomson Reuters, USA
Epson Scanner Programm	Epson, Japan
Illustrator CS5	Adobe
Microsoft Office	Microsoft
Photoshop CS5	Adobe

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekularbiologische Methoden**

Molekularbiologische Standardmethoden, welche in dieser Arbeit nicht weiter erläutert werden, wurden wie bei Sambrook und Russel (2001) beschrieben durchgeführt. Kommerzielle Produkte wurden, soweit nicht anders angegeben, gemäß der Hersteller-Angaben verwendet. Bei Prozentangaben zur Zusammensetzung von Lösungen und Puffern handelt es sich, falls nicht anders vermerkt, um Volumenprozent (v/v).

#### **2.2.1.1 Arbeiten mit RNA**

##### **2.2.1.1.1 RNA-Isolierung aus Säugerzellen**

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus murinen Organen, Geweben oder Embryonen wurden diese präpariert (siehe auch unter 2.2.3.4.3 und 2.2.5.1) und nach Trizol (peqGOLD TriFast<sup>TM</sup>, Peqlab) –Zugabe mit Hilfe eines Dispergiergerätes homogenisiert. Sortierte Zellen (siehe unter 2.2.4.2) wurden direkt in Trizol überführt und mit 1 µl Glycogen (Fermentas) pro ml Trizol versetzt, um die spätere Fällung der RNA in Isopropanol zu unterstützen.

Um die Gesamt-RNA aus humanen und murinen Zellen zu erhalten, wurden die Zellen bei 160 x g, 4 °C für 6 min abzentrifugiert und nach einmaligem Waschen mit PBS in 1 ml Trizol pro  $1 \times 10^6$  Zellen resuspendiert. Nach der Zugabe von 0,2 ml Chloroform (Sigma) pro eingesetztem ml Trizol-Reagenz und anschließendem Schütteln der Reagenzien folgte ein Inkubationsschritt für 5 min bei 20 °C. Durch die Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 13.600 x g wurden die aufgeschlossenen Zellen sedimentiert und die RNA von DNA und Proteinen getrennt. Die in der wässrigen Phase befindliche RNA wurde in ein neues Gefäß überführt und durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem ml Trizol-Reagenz und 10 min Inkubation bei -20 °C gefällt und anschließend bei 18.600 x g für 10 min sedimentiert. Nach einem Waschschrift mit 1 ml 75 % Ethanol (DEPC-Wasser) und weiterer Zentrifugation bei 18.600 x g für 5 min wurde das Pellet getrocknet und in mindestens 10 µl RNase-freiem Wasser (QIAGEN) resuspendiert. Die so gewonnene RNA wurde nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung (Nanodrop) entweder bei -80 °C gelagert oder direkt zur Synthese von cDNA eingesetzt.

### 2.2.1.1.2 Herstellung von cDNA mittels RT-PCR

Zur Einzelstrang-cDNA-Synthese wurde die SuperScript II RT (Reverse Transkriptase) von Invitrogen verwendet. Hierfür wurden bis zu 5 µg der Gesamt-RNA mit 1 µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer (500 µg/ml; Invitrogen), 1 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM) und RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt und für 5 min bei 65 °C erhitzt. Nach raschem Abkühlen auf Eis erfolgte die Zugabe von 4 µl 5x First-Strand Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl RNaseOUT (40 Units/µl, Promega). Der gesamte Ansatz wurde für 2 min bei 42 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl (200 units) SuperScript II RT erfolgte die reverse Transkription bei 42 °C für 50 min. Nach der Inaktivierung der Transkriptase für 15 min bei 70 °C wurde die gewonnene cDNA mit weiteren 10 µl RNase-freiem Wasser verdünnt und anschließend für die quantitative Real-Time-PCR verwendet oder bei -20 °C gelagert.

### 2.2.1.1.3 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) nach der LightCycler-Methode von Roche Diagnostics (FastStart DNA Master SYBR Green Kit) erlaubt eine PCR-Reaktion nach „Echt-Zeit“, da in jeden amplifizierten DNA-Strang ein in der kleinen Furche der dsDNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff eingebaut wird und die zunehmende Fluoreszenz am Ende jeder Elongationsphase gemessen wird. Diese wird von dem LightCycler-Analyse-Programm als Kurve dargestellt und der sogenannte *crossing point* (Cp) angegeben. Durch diesen Punkt erhält man Auskunft darüber, wie viele Zyklen nötig sind, um eine definierte Menge an PCR-Produkt zu erzeugen.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Reaktionen wurde abweichend vom Protokoll in einem Reaktionsvolumen von 10 µl nur 1 µl cDNA und 5 pmol je Primer eingesetzt. Alle in dieser Methode verwendeten Primer (2.1.10.1) sind exonübergreifend, um den Einfluss eventueller Verunreinigungen mit genomischer DNA zu vermeiden. Die PCR-Reaktionen wurden in mit Folie (LightCycler® 480 Sealing Foil, Roche) abgedeckten Multiwellplatten (Roche) mit Hilfe des LightCycler 480II unter folgender Temperaturabfolge in 45 Zyklen durchgeführt:

Ablauf	Temperatur	Zeit
Denaturierung der DNA, Aktivierung der Polymerase	95° C	10 min
Zyklische Denaturierung	95° C	10 sec
Zyklische Hybridisierung	65° C	10 sec
Zyklische Elongation	72° C	4 sec pro 100 bp

45 Zyklen		
Denaturierung	95° C	5 sec
Finale Elongation	65° C	1 min
Schmelzkurven-Analyse	65° C - 97° C	+ 0,11° C pro sec
Abkühlen	40° C	30 sec

Für einige der verwendeten Primerpaare wurde die Effizienz ermittelt, um die Expression der untersuchten Gene auch miteinander vergleichen zu können. Hierzu wurde die Gesamt-cDNA eines Wildtyp-Embryos (E18.5 pc) seriell verdünnt ( $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ;  $10^{-4}$ ;  $10^{-5}$ ) und die entstandenen PCR-Produkte zur Erstellung der Eichgerade zur Ermittlung des Effizienzfaktors verwendet.

Zur Quantifizierung der Menge an Zieltranskript, wurde die relative Quantifizierungsmethode angewendet, welche auf der relativen mRNA-Expression eines Zielgens im Vergleich zu einem Referenzgen basiert. Die Expression der Gene wurde in dieser Arbeit auf die Referenzgene *Hprt* (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase), *Pbgd* (Porphobilinogen Deaminase) und  $\beta$ -*Aktin* standardisiert.

## 2.2.1.2 Arbeiten mit DNA

### 2.2.1.2.1 DNA Präparation

#### 2.2.1.2.1.1 Isolation von Plasmiden aus Bakterien

Plasmid-DNA aus Bakterien (siehe 2.2.1.4.2, anschließende Kultivierung nach Herstellerangaben) wurde für Klonierungen und Transfektionen mit Hilfe der Plasmid-Midi oder -Maxi Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und aufgereinigt.

Zur Analyse von kleinen Mengen an Plasmid wurden 2 ml der Übernacht-Kultur bei  $18.600 \times g$  sedimentiert und das Pellet in 500  $\mu$ l Lysepuffer (80 mg/ml Sucrose (Sigma), 50 mM Tris- HCL pH 8, 0,05 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100 (Roth), 100  $\mu$ g Lysozym C (Sigma) resuspendiert. Nach Erhitzen der Proben bei 95 °C für 70 sec wurden sie für 5 min auf Eis gekühlt.

Die aufgeschlossenen Zellen wurden für 15 min bei 4 °C und  $18.600 \times g$  sedimentiert. Die in dem Überstand befindliche DNA wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 0,7-fachem Volumen an Isopropanol auf Eis präzipitiert. Nach Abzentrifugation bei  $18.600 \times g$  für 10 min (4 °C) wurde die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendierte DNA wurde für Restriktionsverdau verwendet.

#### **2.2.1.2.1.2 Isolation genomischer DNA aus Mausschwanzzellen**

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde ein etwa 0,3 cm langes Stück der Schwanzspitze entfernt und für mindestens 1 h in 100 µl Lysepuffer (1x FirePol Puffer B von Solis BioDyne; 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 µg/ml ProteinaseK) bei 55 °C und 400 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion für 15 min bei 95 °C inaktiviert und 0,7 bis 1 µl der gewonnenen genomischen DNA in die PCR-Reaktion eingesetzt.

#### **2.2.1.2.1.3 Isolation genomischer ES-Zell-DNA im 96-Loch-Format**

Um die genomische DNA der ES-Zell-Klone aus 96-Loch-Platten zu isolieren, wurden die Zellen bis zur 100 %igen Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und je Loch 50 µl Lysepuffer (10 mM Tris pH 7,4 , 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5 % SDS, 1 mg/ml ProteinaseK) zugegeben und anschließend in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 56 °C für mindestens 16 h inkubiert. Nach der Abkühlung der Platten auf Raumtemperatur wurden zur Präzipitation der DNA je Loch 100 µl 98 %-Ethanol zugesetzt. Nach einer Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur wurde die DNA durch 10-minütige Zentrifugation bei 2.300 x g sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Nach dreimaligem Waschen mit je 100 µl 75 %-Ethanol wurde die DNA getrocknet und direkt für den Restriktionsverdau verwendet (siehe 2.2.1.2.3.2).

#### **2.2.1.2.1.4 Isolation genomischer ES-Zell-DNA im 10 cm Platten-Format**

Zur Gewinnung von größeren Mengen an genomischer DNA der ES-Zell-Klone wurden diese auf 10-cm-Platten bis zur 100 %igen Konfluenz kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Lysepuffer (10 mM Tris pH 7,4 , 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5 % SDS, 1 mg/ml ProteinaseK) aufgenommen und für mindestens 16 h bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA über eine Ethanol-Präzipitation isoliert.

#### **2.2.1.2.2 DNA Fällung und Reinigung**

##### **2.2.1.2.2.1 Phenol Extraktion**

Um eventuelle RNA- oder Proteinkontaminationen in der DNA-Lösung zu beseitigen, wurde die DNA-Lösung mit H<sub>2</sub>O auf ein Minimalvolumen von 200 µl gebracht und mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Mischungsverhältnis 25:24:1, Roth) versetzt. Eine Phasentrennung der Lösungen wurde durch starkes Schütteln und anschließende Zentrifugation bei 13.600 x g für 5 min erzielt. Die DNA-haltige, obere Phase wurde in ein

neues Gefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform durch starkes Schütteln vermenget. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die DNA in der oberen wässrigen Phase überführt und durch Ethanol-Präzipitation gefällt.

#### **2.2.1.2.2.2 Ethanol Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen**

Gelöste DNA wurde zuerst mit 1/10-Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8 - 5,0) und 2 ½ Volumen 98 % Ethanol versetzt. Nachfolgend wurde die Mixtur für 20 min bei -20 °C inkubiert und anschließend für 15 min bei 18.600 x g, 4 °C sedimentiert. Das DNA-haltige Pellet wurde mit 3 Volumen 75 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und anschließend in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **2.2.1.2.2.3 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen**

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde spektralphotometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt. Nach Sambrook und Russel (2001) entspricht eine OD<sub>260</sub> von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml RNA. Durch Messung der OD bei einer Wellenlänge von 280 nm können Kontaminationen durch Proteine oder Phenol wahrgenommen werden. Bewegt sich der Wert des Verhältnisses von OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub> zwischen 1,7 bis 2,0, liegt der Reinheitsgrad der Lösung in einem zur enzymatischen Bearbeitung geeigneten Bereich.

#### **2.2.1.2.2.4 Punktgerichtete Mutagenese**

Zur Erzeugung von Punktmutationen wurde das Quick Change® Site-Directed Mutagenesis-Kit der Firma Stratagene verwendet und nach dem Herstellerprotokoll modifiziert durchgeführt. Bei allen in dieser Methode verwendeten Primern wurde darauf geachtet, die punktmutierten Base(n) mittig und von je mindestens 10 Basen flankiert zu legen. Die Sequenz des pro PCR verwendeten Primerpaares wurde überlappend und mit einer Schmelztemperatur von mindestens 70 °C gewählt.

Für den PCR-basierten Teil wurden 100 ng der Plasmid-DNA, je 0,2 pmol der Primer, 0,3 mM dNTPs und 0,05 U/µl der Pfu-Turbo-Polymerase verwendet.

Ablauf	Temperatur	Zeit
Denaturierung der DNA, Aktivierung der Polymerase	95° C	1 min
Zyklische Denaturierung	95° C	30 sec

Zyklische Hybridisierung	55° C	1 min
Zyklische Elongation	68° C	6 min
13 Zyklen		
Finale Elongation	68° C	10 min
Abkühlen	4° C	

Anschließend wurde das Ursprungsplasmid nach Zugabe von 20 U *DpnI*-Restriktionsenzym 1 h bei 37° C verdaut. Nachfolgend wurde die Plasmidlösung für die Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt (siehe 2.2.1.4.2).

### 2.2.1.2.3 Techniken der DNA-Analyse

#### 2.2.1.2.3.1 Fragmentierung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die Enzymeinheit U (*Unit*) ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µg DNA des Phagen Lambda ( $\lambda$ ) in einer Stunde vollständig verdaut. Für Test-Restriktionen wurde standardisiert 1 µg DNA verwendet, für Klonierungen wurden 3 µg DNA eingesetzt. Hierfür wurden 2 bis 5 Einheiten Restriktionsenzym pro µg DNA in einem Reaktionsvolumen verwendet, welches mindestens das Zehnfache des Volumens der zugesetzten glycerinhaltigen Enzymlösung enthielt. Die Inkubation erfolgte für 2 bis 18 Stunden nach den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen.

#### 2.2.1.2.3.2 Enzymatische Fragmentierung genomischer DNA aus ES-Zellen

Zur direkten Spaltung von genomischer DNA in 96-Loch-Platten wurden 35 µl Restriktionslösung (1 mM Spermidin (Sigma), 1 mM DTT, 100 µg/ml BSA (PAA Laboratories), 50 µg/ml RNase, 1/10 Volumen Puffer (10 x), 35 U Enzym/Loch) in jedes Loch pipettiert. Die mit Parafilm versiegelten Platten wurden anschließend in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Für die Spaltung bereits in Wasser gelöster genomischer DNA der ES-Zellen wurden 10 µg der DNA mit 25 µl Restriktionslösung für 16 h bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.1.2.3.3 Southern-Blot

Durch die von Edwin Southern (1975) entwickelte Methode ist es möglich, die elektrophoretisch in einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennte DNA auf eine Membran



zu transferieren und mit Hilfe einer radioaktiv markierten, komplementären Sonde spezifische DNA-Fragmente darauf zu detektieren.

Die mit Restriktionsenzymen gespaltene DNA (2.2.1.2.3.2) wurde nach Zugabe des Ladepuffers (6 x konzentriert, Fermentas) auf ein 0,8 % Agarosegel (PeqLab; 5 µg/ml Ethidiumbromid, Sigma) aufgetragen. Zur späteren Gewährleistung, die Größe der detektierten Fragmente bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein Größenstandard auf das Gel aufgetragen (1 kb DNA-Ladder für Southern Blot). Nach der Auftrennung der DNA im Gel über 24 h bei 25 V durch Agarosegelelektrophorese erfolgte mit einem Lineal unter UV-Licht die fotografische Dokumentation des Gels. Anschließend wurde das Gel für 20 min in 0,25 M HCl unter Schwenken denaturiert. Danach wurde es zweimal kurz mit Wasser gewaschen und 40 min in einem alkalischen Transferpuffer (0,4 M NaOH; 0,6 M NaCl) geschwenkt. Anschließend erfolgte der sogenannte Blot-Aufbau: Auf einen Stapel Papiertücher wurden vier trockene und darauf ein mit Transferpuffer angefeuchtetes Whatman-Papier (Roth) gelegt, danach eine ebenfalls in dem Puffer angefeuchtete Nylon-Membran Hybond-N (Millipore). Auf diese Membran wurde das Gel gelegt und mit drei weiteren angefeuchteten Whatman-Papieren abgedeckt. Zum Schluss wurde die Verbindung zum Transferpuffer-Reservoir über ein langes angefeuchtetes Whatman-Papier hergestellt und der ganze Aufbau mit Frischhaltefolie abgedeckt. Nach 24 h wurde der Blot abgebaut, die Position der Geldaschen markiert und die Membran zweimal für 5 min in 2 x SSC geschwenkt. Nachfolgend wurde die transferierte DNA für 1 h bei 80 °C auf der Membran fixiert.

#### **2.2.1.2.3.4 Markierung der Sonde**

Zum Nachweis der gesuchten genomische DNA wurden 100 ng linearisierte Sonden-DNA mit 50 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (Hartmann Analytic) mit Hilfe des Random Prime Labeling Kits nach Firmenprotokoll radioaktiv markiert. Anschließend wurde die radioaktive DNA mit Hilfe einer G50 Sephadex Säule nach dem Herstellerprotokoll gereinigt und in TE-Puffer eluiert. Die radioaktive Aktivität der inkorporierten Nukleotide wurde mittels eines Szintillationszählers überprüft, da die Sonde mindestens eine Strahlung von 36.000 cpm besitzen sollte.

#### **2.2.1.2.3.5 Hybridisierung der Southern-Blot-Membran**

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen erfolgte eine Prähybridisierung der Southern-Blot-Membran für mindestens 1 h bei 62 °C im Hybridisierungssofen. Hierzu wurde sie vorab

mit 2 x SSC (0,3 M NaCl; 0,03 M NaCitrat) kurz angefeuchtet und in einem Glaszylinder in vorgewärmtem Church-Puffer (0,4 M, Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ); 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ); 7 % SDS; 1 mM EDTA) drehend inkubiert.

Die DNA-Sonde wurde nach einer 10-minütigen Denaturierung bei 100 °C der Hybridisierungslösung beigemischt und die Membran anschließend für 24 h bei 62 °C im Hybridisierungssofen inkubiert. Nach dem Waschen der Membran mit vorgewärmtem Waschpuffer (0,2 x SSC, 0,5 % SDS) bei 58 °C (Bedingungen siehe 2.1.9) konnten die spezifisch an der Membran gebundenen Sonden im Anschluss mit einem fotosensitiven Film (Biomax MS PE Applied Biosystems 35 x 43 cm, KODAK Film) nachgewiesen werden. Bis zu zwei Wochen konnte die in Church-Puffer befindliche radioaktive Sonde aufgehoben und nach 10-minütiger Denaturierung wiederverwendet werden.

#### **2.2.1.2.3.6 Entfernen der Sonde**

Um auf eine Membran gebundenen DNA mit verschiedenen Sonden zu analysieren, wurde die Membran für 15 min in 95 °C heißer Strippinglösung (1 % SDS, 0,1 % SSC) inkubiert und langsam auf 58 °C abgekühlt. Mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fuji Bas 1000, Japan) oder durch Auflegen eines fotosensitiven Filmes wurde untersucht, inwieweit die vorab verwendete Sonde entfernt wurde. Anschließend wurde die Membran für eine erneute Hybridisierung verwendet.

#### **2.2.1.2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Das Prinzip der PCR ist die enzymatisch ermöglichte exponentielle Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnitts zwischen zwei spezifischen Nukleotidsequenzen, an die je ein Desoxyoligonukleotidprimer binden kann. Die verwendeten Taq-Polymerasen sind in der Regel mit hitzelabilen Blockgruppen modifiziert, so dass die Reaktion bei Raumtemperatur inaktiv ist, bei 94 bis 97 °C jedoch gestartet wird.

Prinzipiell setzt sich diese Reaktion aus drei essentiellen Schritten zusammen:

1. Denaturierung der Doppelstrangmatrize zu zwei Einzelsträngen bei 94 bis 97 °C
2. Primerhybridisierung (Annealing) der Oligonukleotide an die komplementäre Matrizensequenz. Die hierzu verwendete Anlagerungstemperatur ( $T_A$ ) hängt von der spezifischen Nukleotidsequenz der Primerpaare ab. Hierbei sollten die in einer Reaktion verwendeten Primer eine ähnliche Anlagerungstemperatur besitzen.

3. Elongation der angelagerten Primer bei 72 °C. Die hierzu benötigte Zeit richtet sich nach der Amplifikatlänge. Für die Phusion-Polymerase werden 15 s pro 1 kb, für die Firepol-Polymerase 1 min pro 1 kb Fragmentlänge gerechnet.

Die Anlagerung der Oligonukleotide ist zudem von der vorhandenen  $Mg^{2+}$ -Konzentration abhängig. Aus diesem Grund wurde in der Regel die vom Hersteller empfohlene Standard- $Mg^{2+}$ -Konzentration gewählt.

#### 2.2.1.2.3.8 Longrange-PCR

Die Longrange-PCR wurde zur Überprüfung der korrekten Insertion der *loxP*-Sequenzen in das endogene *Ebf4* verwendet.

Hierzu wurden 100 ng der genomischen DNA, je 10 pmol der Primer, 0,3 mM dNTPs, 1/50 Volumen DMSO und 0,1 U/μl der LongAmp-Taq DNA-Polymerase verwendet.

Ablauf	Temperatur	Zeit
Denaturierung der DNA, Aktivierung der Polymerase	93° C	3 min
Zyklische Denaturierung	92° C	15 sec
Zyklische Hybridisierung	65° C	30 sec
Zyklische Elongation	65° C	8 min
8 Zyklen, -1° C (Hybridisierungs-Temperatur)/Zyklus		
Zyklische Denaturierung	92° C	15 sec
Zyklische Hybridisierung	55° C	30 sec
Zyklische Elongation	65° C	8 min
30 Zyklen		
Finale Elongation	65° C	10 min
Abkühlen	4° C	

Das Produkt wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben isoliert und anschließend sequenziert.

### 2.2.1.3 Arbeiten mit Proteinen

#### 2.2.1.3.1 Proteinextraktion aus Säugerzellen für Western-Blot-Analysen

Zur Extraktion von Proteinen aus murinen Organen, wurden diese aus den Tieren präpariert (siehe auch unter 2.2.3.4.3) und in 500 μl Lysepuffer (50 mM Tris-HCL pH 8, 150 mM NaCl,

1 % NP40 (Sigma), 1 µg/ml Leupeptin (Roche), 1 µg/ml Aprotinin (Roche), 100 µg/ml PMSF (Roche)) aufgenommen. Nach der Homogenisierung mit Hilfe eines Dispergiergerätes wurden die Zellen 40 min auf Eis lysiert. Nach Abzentrifugation bei 18.600 x g für 5 min (4 °C) wurde der Überstand in ein vorgekühltes Gefäß überführt und für weiterführende Analysen verwendet oder ggf. bei -20 °C gelagert.

Um Proteine aus Zellkultur-Experimenten zu extrahieren wurden mindestens  $1 \times 10^6$  Zellen für 6 min bei 160 x g sedimentiert und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in Lysepuffer resuspendiert und, wie oben erläutert, verfahren.

#### **2.2.1.3.2 Proteinextraktion für Luziferase-Reporter-Assays**

Die mit Luziferase-Reporter-, Überexpressionsvektor- und *lacZ*-Reporterplasmid transfizierten Zellen wurden 48 h nach der Kotransfektion mit PBS gewaschen und in 90 µl Luziferase-Extraktionspuffer (10 % Glycerin; 1 % Triton X-100; 2 mM EDTA; 25 mM Tris (HCl) pH 7,8; 2 mM DTT) für 15 min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde anschließend für 15 min bei 18.600 x g und 4 °C sedimentiert und der Überstand in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

Um vergleichbare Transfektionen durchzuführen wurden in allen Experimenten 5 µg (adhärente Zellen) bzw. 42 µg (Ba/F3) der Gesamt-Plasmid-DNA transfiziert. Eine eventuell geringere Menge wurde durch Kotransfektion eines für den Assay irrelevanten Leervektors (pBS II-KS) ausgeglichen.

#### **2.2.1.3.3 Proteinextraktion von Kernproteinen für Gelretardierung**

Zur Extraktion der Kernproteine aus Zelllinien wurden  $2 \times 10^7$  Zellen mit PBS gewaschen und nach der Zentrifugation für 6 min bei 160 x g in 0,2 ml Sedimentationspuffer (10 mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA (Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure); 1 mM DTT; 1 mM Proteinaseinhibitoren (complete mini Tablette/10 ml, Roche)) aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Die anschließende Zugabe von 12,5 µl NP40 (Fluka) sorgt für einen spezifischen Aufbruch der Zellmembran, ohne jedoch die Kernmembran zu beeinträchtigen. Die Proben wurden bei 4 °C für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit geschüttelt (Vortexer) und anschließend für 10 min bei 18.600 x g und 4 °C sedimentiert. Nach einem Waschschriff mit 1,5 ml Sedimentationspuffer wurden die im Pellet befindlichen Zellkerne in 40 µl frisch hergestelltem Proteinextraktions-puffer (20 mM HEPES pH 7,9; 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mM Proteinaseinhibitoren) aufgenommen und wiederum bei

maximaler Geschwindigkeit für 30 min bei 4 °C geschüttelt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min wurde der proteinhaltige Überstand aliquotiert und nach der Bestimmung der Proteinkonzentration für weitere Analysen verwendet oder ggf. in flüssigem Stickstoff (-196 °C) und anschließend bei -80 °C eingefroren.

#### **2.2.1.3.4 *In vitro* Translation von Proteinen**

Die *in vitro* Translation rekombinanter Proteine mittels T7-Promotor-basierter Vektoren für Gelretradierungsanalysen wurde nach dem Protokoll von „TnT®-coupled Reticulocyte Lysate Systems“ der Firma Promega durchgeführt.

#### **2.2.1.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Reagenz**

Um die Proteinkonzentration von Zellextrakten zu bestimmen, wurde BSA (PAA Laboratories) in den Konzentrationen 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 µg Protein/ml zur Erstellung der Eichkurve verwendet. Die Proteinlösung wurde mit zuvor nach Angaben des Herstellers erzeugter BCA-Mixtur (50:1 Mischung der Reagenzien A und B; Pierce) ad 400 µl versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation konnte die optische Dichte bei 562 nm photometrisch bestimmt werden.

Der auftretende Farbumschlag der Proben in dieser Reaktion ist auf die im Extrakt enthaltenen Proteine zurückzuführen, welche die Cu<sup>2+</sup>-Ionen des BCA-Reagenz zu Cu<sup>+</sup>-Ionen reduzieren, welche anschließend mit Bicinchoninsäure einen violetten Komplex bilden.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde jeweils 1 µl der extrahierten Proteine (2.2.1.3.1 oder 2.2.1.3.3) verwendet und parallel zur Eichkuve mit 399 µl des hergestellten BCA-Reagenz vermischt, inkubiert und gemessen. Um die tatsächliche Konzentration der Proteine zu erhalten, wurde die vom Photometer ermittelte Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor der Eichkurve multipliziert.

#### **2.2.1.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen**

Die diskontinuierliche SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970) dient der Auftrennung von Proteinen aus Zellextrakten.

In der Regel wurden in dieser Arbeit 15 - 30 µg Proteinlysate in 2 x Laemmli-Puffer (4 % SDS, 20 % Glycerin, 250 mM Tris-HCl pH 6,8, 5 % β-Mercaptoethanol, Gibco; 0,01 % Bromphenolblau, Sigma) aufgenommen und für 10 min bei 95 °C (800 rpm) in einem Thermoschüttler aufgekocht. Durch das Detergenz SDS werden negative Ladungen an die

Proteine angefügt, um sie anschließend ihrer Größe nach auftrennen zu können. Zudem wird eine erneute Faltung verhindert und durch die Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol werden die Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten reduziert. Die vorbereiteten Proben wurden auf das mit 1 x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 1 % SDS; 192 mM Glycin) überschichtete Gel in einer PAGE-Apparatur aufgetragen. Das Acrylamidgel bestand aus einem Sammelgel (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 5 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1), Roth) zur Fokussierung der geladenen Proteine und einem Trenngel (375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 10 – 15 % Acrylamid/Bi-Acrylamid; Mischungsverhältnis 29:1), zur Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse. Zur Polymerisation der Gele wurden APS (Ammoniumperoxodisulfat; Roth) und TEMED (Tetramethylethyldiamin; Roth) verwendet. Für den Größenvergleich wurde ein Proteinstandard mitgeführt. Die Elektrophorese wurde bei 80 V durchgeführt.

#### **2.2.1.3.7 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen**

Für Western-Blot-Analysen wurde der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine proteinbindende Nitrozellulosemembran nach Towbin *et al.* (1979) durchgeführt. Nach dem „semi-dry“ Verfahren wurden hierzu Whatman-Papiere (Roth), Nitrozellulosemembran und das Gel mit Blotting-Puffer (20 % Ethanol; 80 % 1 x SDS-Laufpuffer) zuerst äquilibriert und anschließend übereinander geschichtet. Die Proteine wurden anschließend in einer Transferkammer bei 11 V, 300 mA für 1,5 h transferiert. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung (2 % Ponceau S, Sigma; 30 % Trichloressigsäure, 30 % Sulfosalicylsäure) gefärbt. Für die anschließende Immundetektion wurde die Membran vor der Inkubation des ersten Antikörpers für 1 h in 5 %-Milchpulver (Roth) -PBST-Lösung (0,4 % Tween 20 (Sigma) in PBS; Detergenz zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen) blockiert.

#### **2.2.1.3.8 Immundetektion von Proteinen**

Die Membran wurde mit dem Erstantikörper, welcher in einer 5 %-Milchpulver-PBST-Lösung verdünnt wurde, über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Nach anschließendem dreimaligen Waschen (je 10 min mit PBST) der Membran wurde diese mit dem Sekundärantikörper für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zweitantikörper bindet hierbei spezifisch an das Fc-Fragment des Erstantikörpers. Danach wurde die Membran wiederum dreimal für 10 min in PBST gewaschen. Anschließend wurde mit dem

Detektionsreagenz (1ml Lösung A (0,1M Tris-HCL pH 8,6, 0,25 mg/ml Luminol), 0,3 µl Lösung B (30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Wasserstoffperoxid), 100 µl Lösung C (1,1 mg/ml Para-Hydroxy-Conmarinsäure in DMSO); alle Reagenzien von Sigma Aldrich bezogen) die Chemolumineszenz-Reaktion angeregt. Die Oxidation des zyklischen Diacylhydrazides Luminol durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich (*Horseradish*)-Peroxidase (HRP) wurde durch einen lichtsensitiven Film (Hyperfilm ECL, Amersham) detektiert. Die für die Immundetektion verwendeten Antikörper wurden unter 2.1.4 aufgelistet.

#### **2.2.1.3.9 Entfernen der Antikörper**

Um die an die Membran gebundenen Antikörper zu entfernen und die Membran einer weiteren Immundetektion zu unterziehen, wurde diese für 10 min in einer Strippinglösung (100 mM Glycin (Roth), 1 % SDS, 0,1 % NP40 (Fluka), pH 2,2) geschwenkt. Nach 10 min Waschen mit PBST wurde sie wieder für 1 h in 5 %-Milchpulver-PBST-Lösung blockiert und erneut mit den gewünschten Antikörpern inkubiert.

#### **2.2.1.3.10 Coomassie-Färbung**

Die Coomassie-Färbung wurde standardmäßig zur Überprüfung des korrekten Transfers der Proteine aus dem Gel, aber auch zum direkten Beweis von Proteinen genutzt. Hierzu wurde das Gel in Coomassie-Blau (2,2 g/l Brillantblau (Roth), 56 % Essigsäure) 20 min unter Schwenken gefärbt. Nach kurzem Waschen mit Wasser wurde das Gel hinterher mit Coomassie-Entfärber (10 % Essigsäure, 40 % Ethanol) ca. 40 min inkubiert, bis die unspezifische Färbung verblasst war. Zur Aufbewahrung wurde das Gel auf einem Whatman-Papier mit Hilfe eines Geltrockners (BioRad) unter Vakuum und Wärmeeinwirkung getrocknet (80 °C, 1 h.)

#### **2.2.1.4 Arbeiten mit *E. coli* Bakterien**

##### **2.2.1.4.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien**

Zur Herstellung aller im Labor verwendeten *E. coli* Bakterienstämme wurden diese aus einer gefrorenen Stammkultur auf einer LB-Agarplatte (17 g/l Agar Agar (Invitrogen) in LB-Medium) ohne Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Eine Kolonie wurde am nächsten Tag mit einer Pipettenspitze isoliert und in 15 ml LB-Medium (25 g/l Luria Broth Base (Invitrogen) in H<sub>2</sub>O) über Nacht bei 37° C angeimpft. Diese Vorkultur

wurde anschließend in 900 ml SOB-Medium (Super Optimal Broth Medium; 2 % Bacton Trypton, 0,5 % Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> pH 7 (NaOH)) angeimpft und bei 37° C bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,6 kultiviert. Die Kultur wurde nachfolgend für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 2.500 x g für 10 min bei 4° C sedimentiert. Das Pellet wurde in 80 ml vorgekühltem TB-Puffer (10 mM Pipes, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl in H<sub>2</sub>O pH 6,7, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, sterilfiltriert) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt (siehe oben) wurde das Pellet in 20 ml vorgekühltem TB-Puffer resuspendiert und DMSO bis zu einer finalen Konzentration von 7 % hinzugegeben. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde das Bakteriengemisch aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren. Die Lagerung der Bakterienstammkulturen erfolgte bei -80° C.

#### **2.2.1.4.2 Transformation von *E. coli* Bakterien**

Um Plasmid-DNA in *E. coli* Bakterien zu vervielfältigen, wurden in der Regel 100 ng Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz mit 100 µl chemisch kompetenten Bakterien gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock für 45 sec bei 42° C wurden die Bakterien für weitere 2 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde frisches LB-Medium ohne Antibiotikum zugegeben und die Suspension für 30 min bei 37° C im Thermoblock geschüttelt (400 rpm). Nachfolgend wurde das Bakteriengemisch zur Selektion aller transformierten Zellen auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert.

### **2.2.2 Biochemische Methoden**

#### **2.2.2.1 Luziferase- und $\beta$ -Galaktosidase-Test**

##### **2.2.2.1.1 Luziferase-Messung**

Zur Messung der Luziferase-Aktivität wurde je Loch 10 µl der Protein-Extrakte (siehe 2.2.1.3.2) in eine Luziferase-Mikrotiterplatte pipettiert. Nachfolgend wurde die Lumineszenz der Extrakte nach der automatisierten Zugabe von 50 µl Luziferase-Assaypuffer (20 mM Tricin, 1,07 mM Magnesiumcarbonat Pentahydrat, 2,67 mM MgSO<sub>4</sub>, 33,3 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 530 µM ATP (Roche), 270 µM Acetyl-Coenzym A (Roche), 470 µM D(-)-Luciferin (Roche), pH 5,8) in einem Luminometer Plattenlesegerät ausgelesen (Wellenlänge 560 nm).



#### **2.2.2.1.2 $\beta$ -Galaktosidase-Messung**

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Messung diente der Normalisierung der in der Luziferase-Messung erhaltenen Werte. Hierzu wurden von den Extrakten jeweils 10  $\mu$ l pro Loch in eine zweite Luziferase-Mikrotiterplatte vorgelegt. Nach Zugabe von je 100  $\mu$ l  $\beta$ -Gal-Assaypuffer (1 % GalactonPlus®/Serva (Topix), 1 mM  $MgCl_2$ , 100 mM Na-P pH 8) pro Loch wurde der Ansatz 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Gerät erfolgte anschließend die automatisierte Zugabe von 50  $\mu$ l  $\beta$ -Gal-Verstärkungspuffer (0,2 M NaOH; 10 % Emerald<sup>TM</sup> Enhancer, Topix) und damit die Messung entsprechend dem Luziferase-Test (Wellenlänge 475 nm).

#### **2.2.2.2 Gelretardierung**

##### **2.2.2.2.1 Oligonukleotid-Annealing**

Für die Annealing-Reaktion wurden equimolare Mengen (250 ng/ $\mu$ l) der beiden Einzelstrang-Oligonukleotide (siehe 2.1.10.5) in Annealing Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4; 10 mM  $MgCl_2$ ; 50 mM NaCl) gemischt und bei 95 °C für 10 min im Thermoblock denaturiert. Anschließend wurde der Heizblock ausgeschaltet und gemeinsam mit den Proben langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

##### **2.2.2.2.2 Radioaktive Markierung der Oligonukleotide**

Die Guanosin-Überhänge des durch die Annealing-Reaktion erhaltenen doppelsträngigen Oligonukleotides wurden zunächst mit 50  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (Hartmann Analytic) radioaktiv markiert. Hierzu wurden 2  $\mu$ l annealtes Oligonukleotid (25 ng/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l Klenow Fragment (2 U/ $\mu$ l; Roche), 2  $\mu$ l 10 x NEB2-Puffer, 50  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP, 2  $\mu$ l dATP, dGTP, dTTP (500  $\mu$ M, Fermentas) und 7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Oligonukleotid mit Hilfe einer Sephadex® G50 Säule und TE-Puffer gereinigt und eluiert und die erfolgte Markierung mittels eines Szintillationszählers überprüft, da zur Vergleichbarkeit von jedem zu untersuchenden Oligonukleotid 8.000 cpm eingesetzt werden sollten. Die zur Kompetition verwendeten „kalten Oligonukleotide“ wurden parallel hergestellt: 2  $\mu$ l annealtes Oligonukleotid (250 ng/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l Klenow Fragment (2 U/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l 10 x NEB2-Puffer, 2  $\mu$ l dNTPs (500  $\mu$ M), 13  $\mu$ l H<sub>2</sub>O wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert. Alle dieser Reaktion unterzogenen Oligonukleotide wurden bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

### **2.2.2.2.3 Bindereaktion von Proteinen an radioaktiv markierte Oligonukleotide**

Für die Bindereaktion wurden in der Regel 5 µg der Protein-Extrakte oder 5 µl der *in vitro* translatierten Proteine (2.2.1.3.3 oder 2.2.1.3.4) verwendet. Diese wurden mit 5 µl 4 x Bindepuffer (10 mM HEPES pH 7,9; 70 mM KCl; 4 % Glycerin; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 x Protease-Inhibitor (complete mini Tabletten; Roche), 2 µl Poly(dIdC) (1 mg/ml, Sigma) 2 µl BSA (1 mg/ml); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>) und ggf. 2 µl anti-Flag-Antikörper (2.1.4) gemischt. Nach einer Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur folgte die Zugabe von 8.000 cpm des radioaktiv markierten Oligonukleotides und dem gleichen Volumen an kalten Oligonukleotiden in die Kompetitions-Kontrolle und wurde auf 20 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Nach einer Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur wurden die Ansätze auf ein natives, nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen.

### **2.2.2.2.4 EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)**

Der EMSA dient zum Nachweis von DNA-bindenden Proteinen mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden. Ihrer Komplexgröße nach aufgetrennt kann anschließend eine Bindung des Proteins mit den Oligonukleotiden von der *Supershift*-Komplexbindung aus Protein, DNA und Antikörper unterschieden werden. Als Kontrolle unspezifischer Bindungen dienen hierbei sowohl die kalten Oligonukleotide, welche im Überschuss zugegeben werden und damit die markierten Oligonukleotide kompetitieren, als auch Oligonukleotide mit Punktmutationen, bei welchen die Bindung unterbunden wird. Die Verwendung von Kernproteinextrakten bei der Gelretardierung vermindert hierbei unspezifische Signale.

Die Proben aus der Bindereaktion (2.2.2.2.3) wurden auf einem Polyacrylamidgel (4 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (Rotiphorese Gel 40 (29:1); Roth), 0,5 x TBE; 0,1 % APS (Ammoniumperoxodisulfat; Roth), 0,002 % TEMED (Tetramethylethyldiamin; Roth) im elektrischen Feld bei 130V aufgetrennt. Das Gel wurde nachfolgend auf einem Whatman-Papier mit Hilfe eines Gelrockners unter Vakuum für 1 h bei 80 °C getrocknet. Die markierten Komplexe auf dem Gel ließen sich im Anschluss mit einem fotosensitiven Film (Biomax MS PE Applied Biosystems 35 x 43 cm, KODAK Film) nachweisen.

## **2.2.2.3 Histologische Analysen**

### **2.2.2.3.1 Vorbereitung des Gewebes**

Die wie unter 2.2.5.2 beschrieben isolierten Diaphragmen wurden durch Dr. Tanja Klein-Rodewald (HMGU München) dreimal je 20 min mit Cacodylatpuffer (pH 7.4, Science

Services) gewaschen. Anschließend wurden die Proben für 1 -2 h in Chromosmiumsäure (1,25 % Kaliumbichromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) pH 7.2, 1 % Osmiumtetroxid ( $OsO_4$ ), 0,85 % NaCl) nachfixiert. Nach dreimaligen Waschen mit Wasser für je 10 min wurden die Proben schrittweise für je 15 min entwässert (50 % bis 96 %), um abschließend dreimal für 15 min in 98 % Ethanol und zweimal für 30 min in Propylenoxid (Merck) inkubiert zu werden. Die Diaphragmen wurden über Nacht in ein 1:11-Gemisch aus Epon (246 mg/ml Dodecenylnorborneneanhydrid (Merck), 326 mg/ml Methyl Norbornen-1,3-dicarbonsäureanhydrid (Roth), 522 mg/ml Glydether 100 (Epon 812, EMS), 15 µl/ml 2,4,6-Trisdimethylaminomethyl-phenol (Roth) und Propylenoxid (Merck) eingelegt und am nächsten Tag in mit Epon gefüllten Kapseln bei 60 °C eingebettet. Mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Leica) konnten nach 48 h die Schnitte (60 nm bis 1 µm) der Diaphragmen hergestellt werden. Die Schnitte wurden anschließend einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung oder einer elektronenmikroskopischen Analyse (Transmissions-Elektronenmikroskop EM 10 CR, Zeiss) unterzogen.

#### **2.2.2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Diese Färbung dient der Analyse von Gewebe. Das zu Hämalan entwickelte Hämatoxylin färbt hierbei alle sauren bzw. basophilen Strukturen, wie z.B. DNA, blau, während das Eosin alle basischen bzw. acidophilen Strukturen, wie z.B. Plasmaproteine, rötlich färbt.

Zur Analyse von Organen wurden die auf Objektträgern fixierten Schnitte (siehe 2.2.2.3.1) durch Dr. Tanja Klein-Rodewald schrittweise entparaffiniert (98 % Ethanol bis  $H_2O$ ) und für mindestens 4 min in Hämatoxylin-Lösung (nach Mayer, 0,2 g/l Natrium-Jodat, 91,8 g/l Kaliumaluminiumsulfat, 50 g/l Chloralhydrat, 1 g/l Zitronensäure, 1 g/l Hämatoxylin; Merck) eingelegt. Durch Wässern wurden die Proben „gebläut“. Anschließend wurden die Schnitte für 20 sec mit stabilem Eosin (0,17 % Essigsäure, 0,58 % Natriumacetat, 5 g/l Eosin Y; Merck) gefärbt und wiederum gewässert. Nach einer aufsteigenden Ethanolreihe (30 % bis 98 %) wurden die Schnitte für 5 min in Xylol (Merck) eingelegt und abschließend mit Hilfe von Eukitt (Kindler) überschichtet und mit einem Deckglas (Roth) bedeckt.

#### **2.2.2.4 *In situ* Hybridisierung**

##### **2.2.2.4.1 Sondenherstellung**

Die Plasmide für die ISH-Sonde 1 (pBS II-KS(+)-Ebf4-*antisense* ISH1 und pBS II-KS(+)-Ebf4-*sense* ISH1) wurden jeweils mit der Restriktionsendonuklease *XhoI* linearisiert. Das für

die ISH-Sonde 2 kodierende Plasmid (pCR-II-Topo-Ebf4-*antisense* ISH2) wurde mit den Restriktionsenzymen *SpeI* (*antisense*) oder *XhoI* (*sense*) linearisiert (siehe 2.2.1.2.3.1). Die anschließende Transkription in einem Volumen von 30 µl mit dem T7 bzw. dem Sp6-Promotor wurde durch Miriam Homburg im Institut für Entwicklungsbiologie (Arbeitsgruppe Dr. Daniela Vogt-Weisenhorn, HMGU München) folgender Maßen durchgeführt:

Das Hybridisierungsgemisch (3 µl 10x Transkriptionspuffer, 1 µl 0,5 M DTT, 1 µl RNAsin, 1,5 µg linearisiertes Plasmid, 1 µl RNA Polymerase) wurde mit 7 µl [ $\alpha$ -thio-<sup>35</sup>S]-UTP (12.5 mCi/mM) gemischt, mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 30 µl gebracht und anschließend 3 h bei 37 °C inkubiert, wobei nach der ersten Stunde weitere 0,5 µl der Polymerase zugegeben wurden. Der Prozess wurde durch Zugabe von 2 µl RNase-freier DNase I für 15 min bei 37 °C abgebrochen. Die Sonden wurden über ein RNase Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und mittels Szintillationszähler auf ihre radioaktive Strahlung hin gemessen.

#### **2.2.2.4.2 *In situ* Hybridisierung und Nissl-Färbung**

Durch die von Mary Lou Pardue und Joe Gall (1969) entwickelte Methode ist es möglich, Nukleinsäuren in Geweben und einzelnen Zellen nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde hierzu durch Miriam Homburg im Institut für Entwicklungsbiologie (Arbeitsgruppe Dr. Daniela Vogt-Weisenhorn, HMGU München) eine radioaktiv markierte RNA-Sonde hergestellt, deren Detektion auf einem Röntgenfilm erfolgte. Um Hintergrundsignale von den spezifischen Signalen unterscheiden zu können, wurde als Kontrolle eine RNA in *sense*-Richtung der zu untersuchenden RNA-Sequenz verwendet.

Für die *in situ* Hybridisierung wurden die Paraffinschnitte (2.2.5.3) unmittelbar zuvor rehydriert und vorbereitet, indem sie für 15 min in RotiHistol® inkubiert und anschließend zweimal 5 min in 98 % Ethanol und ein Mal in 70 % Ethanol (DEPC-Wasser) gelegt wurden. Danach erfolgten zwei 3-minütige Waschschrte mit zuerst DEPC-Wasser und dann mit PBS (DEPC-Wasser) und eine anschließende Nachfixierung für zweimal 5 min in 4 % PFA (in PBS). Daran anknüpfend wurden die Schnitte wiederum zweimal in PBS (DEPC-Wasser) gewaschen und anschließend erfolgte für 7 min eine Inkubation mit Proteinase K (20 µg/ml Proteinase K, 50 mM Tris (HCl), 5 mM EDTA pH 7,6). Nach einem weiteren Waschschrte mit PBS (DEPC-Wasser) wurden sie für 10 min mit 0,1 M Triethanolamin (pH 8, HCl) behandelt. Anschließend folgte eine zweimalige Inkubation für 5 min in SSC (DEPC-Wasser) und eine Dehydration in jeweils 1 min-Schritten (60 % bis 98 %, je mit DEPC-Wasser). Nach Trocknung der Schnitte bei Raumtemperatur wurden diese folgender Maßen prähybridisiert:

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden diese zuerst für 1 h bei 62 °C mit einem Hybridisierungs-Gemisch ohne radioaktiv markierte Sonde in feuchter Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden ca. 5 Millionen cpm pro Objektträger mit Hilfe des Hybridisierungs-Gemisches auf ein Volumen von 100 µl gebracht und für 2 min auf 90 °C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurde das Gemisch auf die prähybridisierten Schnitte pipettiert und über Nacht bei 62 °C in feuchter Atmosphäre inkubiert.

Am Tag darauf wurden die Schnitte bei Raumtemperatur viermal mit 4 x SSC behandelt und anschließend für 20 min bei 37 °C mit RNase A (20 µg/ml RNase A, 0,5 M NaCl, 10 mM Tris (HCl), 5 mM EDTA, pH 8) behandelt. Nachfolgend wurden sie jeweils 10 min bei Raumtemperatur in 1 mM DTT mit zuerst 2 x, dann 1 x und anschließend 0,5 x SSC eingelegt. Als nächstes wurden die Objektträger zweimal 30 min bei 64 °C in 0,1 x SSC/ 1 mM DTT und dann zweimal für 10 min bei Raumtemperatur in 0,1 x SSC inkubiert. Darauf folgend wurden die Objektträger jeweils 1 min einer aufsteigenden Ethanolreihe (30 %, 50 %, 70 %) mit 300 mM Ammoniumacetat (NH<sub>4</sub>OAc) und ohne NH<sub>4</sub>OAc (95 %, 98 %) unterzogen. Die Schnitte wurden anschließend getrocknet und für 2 Tage mit einem fotosensitiven Film (Biomax MR Applied Biosystems, KODAK Film) exponiert. Für eine detaillierte Analyse wurden die Objektträger hinterher in ein 1:2-Gemisch aus Photoemulsion (Kodak NTB2 Emulsion, Integra Biosciences, Fernwald) und Wasser getaucht und für 4 Wochen bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Nach dieser Zeit wurden die Objektträger für 1 h bei Raumtemperatur erwärmt und für 5 min in Entwicklerlösung (Kodak D 19, Sigma- Aldrich, Deisenhofen) getaucht. Nach 7-minütiger Fixierung (Kodak Fixer, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) wurden die Objektträger für 25 min mit Wasser gespült und die Emulsion auf der Rückseite abgekratzt. Anschließend wurden diese für ca. 1 – 5 min in Kresylviolett-Färbelösung (Merck) getaucht, kurz mit Wasser abgespült und in 70 % Ethanol gehalten, bis der Objektträger klar war. Nachfolgend wurden die Schnitte 10 – 60 sec mit 0,5 % Essigsäure in 96 % Ethanol behandelt, zweimal jeweils 1 min mit 96 % Ethanol und zweimal 2 min mit 98 % Ethanol dehydriert. Nach der darauffolgenden 20-minütigen Xylol-Behandlung (Merck) wurden die Schnitte mit DPX-Einschlussmittel (VWR International GmbH, Wien) überschichtet und mit einem Deckelglas (Roth) bedeckt.

## 2.2.3 Zellkulturtechniken

### 2.2.3.1 Kultivierung der Zellen

#### 2.2.3.1.1 Allgemeine Zellkultur-Techniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Umluft-Sterilbank und unter Verwendung steriler Einweg-Pipetten sowie Lösungen durchgeführt. Die beschriebenen Methoden der ES-Zellkultur richten sich leicht abgewandelt an die Protokolle von Pasparakis und Kollias (1995) und Kühn und Torres (2002). Alle Zellen wurden in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in an die jeweiligen Zellen angepassten Medien kultiviert. Das Medium der embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) wurde jeden Tag gewechselt, bei allen anderen Zellen jeden dritten Tag. Um bei adhärenz wachsenden Zellen eine gute Festsetzung zu ermöglichen, wurden die Zellkulturplatten zum Teil mit Gelatine beschichtet. Hierzu wurden die Platten 30 min bei Raumtemperatur mit einer Gelatinelösung inkubiert (2 % Gelatine (Sigma) in DPBS). Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 160 x g für 6 min (4 °C) durchgeführt.

Um eventuelle Mykoplasmen-Kontaminationen zu untersuchen, wurden regelmäßig 500 µl des Kulturmediums von den Zellen abgenommen und im Thermoblock 10 min lang bei 95 °C und 450 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 9.500 x g für 10 min sedimentiert, der Überstand überführt und mittels PCR (Primersequenzen aufgeführt unter 2.1.10.6) analysiert:

Ablauf	Temperatur	Zeit
Denaturierung der DNA, Aktivierung der Polymerase	94° C	5 min
Zyklische Denaturierung	94° C	30 sec
Zyklische Anlagerung	56° C	30 sec
Zyklische Verlängerung	72° C	45 sec
30 Zyklen		
Finale Elongation	72° C	10 min
Abkühlen	4° C	

Kontaminierte Zellen wurden 2 Wochen lang in Vollmedium inklusive 5 µl/ml Ciprobay®400 kultiviert. Sortierte Zellen wurden zur Vermeidung einer potentiellen Mykoplasmen-Kontamination ebenfalls 2 Wochen lang mit Ciprobay®400 behandelt.

<b>Zelllinie/ Zelltyp</b>	<b>Wachstum</b>	<b>Medium</b>	<b>FKS</b>	<b>L-Glu- tamin</b>	<b>Pen/ Strep</b>	<b>weitere Zusätze</b>
70/Z3	Suspension	RPMI	10 %	1 %	1 %	1 % Natrium Pyruvat
18-81 TK+	Suspension	1640				0,003 % $\beta$ -ME
Ba/F3	Suspension	RPMI 1640	10 %	1 %	1 %	10 % steril-filtrierter WEHI-Überstand
2018	adhärent	DMEM	10 %	1 %	1 %	---
AFT024	adhärent					
C2C12	adhärent					
GP+ E86	adhärent					
HEK293T	adhärent					
HeLa	adhärent					
CH3T10½	adhärent	MEMalpha	10 %	1 %	1 %	---
MC3T3	adhärent					
Primäre Obl	adhärent					
WEHI-3B	adhärent	RPMI 1640	10 %	---	---	---
Whitlock	adhärent	RPMI	10 %	---	---	0,003 % $\beta$ -ME
Witte		1640				
EF-Zellen	adhärent	DMEM	10 %	1 %	---	---
IDG3.2	adhärent	DMEM für ES-Zellen	12 %	1,5 %	---	1 % Natrium Pyruvat 1 % MEM NEAA 0,25 % $\beta$ -ME 900.000 U LIF

Obl, Osteoblasten.

### 2.2.3.1.2 Ablösen von adhärenenten Zellen

Adhärenente Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 80 - 90 % zuerst mit DPBS gewaschen und anschließend mit 37 °C warmem 1 x Trypsin-EDTA 2 - 8 min inkubiert. ES-Zellen wurden in der Regel alle 2 - 3 Tage passagiert, wenn der Großteil der Zellkolonien eine kugelige, klar abgegrenzte Struktur zeigte. Dem Trypsin wurden hierzu zusätzlich 2 % Hühnerserum zugesetzt, um die Reaktion weniger aggressiv zu machen. Die Enzymreaktion wurde mit dem 5-fachen Volumen Vollmedium gestoppt, die Zellen abzentrifugiert und je nach Verwendungszweck (Passagieren, Ernten, Aussäen, Kryokonservierung) in dem

entsprechenden Medium aufgenommen. Suspensionszellen wurden spätestens ab  $10^7$  Zellen pro ml durch Aufteilen in neues Zellkulturmedium verdünnt.

#### **2.2.3.1.3 Bestimmung der Zelldichte**

Zur Bestimmung der Zelldichte wurden adhärente Zellen trypsinisiert und in Suspension gebracht. Anschließend wurden 50 µl der Zellsuspension in 10 ml PBS verdünnt und im CASY TTC gemessen. Das Gerät errechnet spannungsbasiert anhand der editierten Parameter nach dreimaliger Zählung die Zellzahl pro ml der Ausgangssuspension.

#### **2.2.3.1.4 Kryokonservierung von Zellen**

Am Vortag wurden die Zellen mit frischem Medium kultiviert oder passagiert, um sie für die Kryokonservierung in eine exponentielle Wachstumsphase zu bringen. Zur Kryokonservierung wurden sie in Einzelzellsuspension gebracht, sedimentiert und in kaltem Einfriermedium (90 % FKS; 10 % DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen portioniert. Die Zellen wurden zunächst bei -80 °C in einem mit Isopropanol gefüllten Kryogefäß abgekühlt und nach zwei Tagen in flüssigen Stickstoff bei -196 °C gelagert.

Zur Kryokonservierung von Zellen im 96-Loch-Format wurden diese trypsinisiert, durch mehrfaches Pipettieren in Einzelzellsuspension gebracht und die Reaktion durch 2-fach konzentriertes Einfriermedium (80 % FKS; 20 % DMSO) abgestoppt. Mit Mineralöl (Sigma) überschichtet wurden die Platten mit Parafilm versiegelt und mit Zellstoff umwickelt. Derart eingefrorene Zellen können nur bei -80 °C eingefroren werden und müssen spätestens nach zwei Monaten erneut kultiviert werden, da die Lebensdauer der Zellen bei -80 °C begrenzt ist. Zur Wiederverwendung von Zellen wurden diese schnell auf 37 °C erwärmt und in 10-fachem Volumen des entsprechenden Vollmediums aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert, um das toxische DMSO zu entfernen, in neuem Medium aufgenommen und ausgesät.

#### **2.2.3.1.5 Kultivierung und Differenzierung von primären Osteoblasten**

Zur Induktion der Differenzierung primärer Osteoblasten wurden drei Tage nach der Isolation aus Calvariae (siehe 2.2.3.4.2) dem Vollmedium  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbinsäure zugefügt (nach Kieslinger *et al.*, 2005).

Differenzierungsmedium: Medium für osteoblastäre Zellen mit 100 mM  $\beta$ -Glycerophosphat und 50 ng/ml Ascorbinsäure.



#### **2.2.3.1.6 *In vitro* Differenzierung von C2C12-Zellen**

Zur Differenzierung der C2C12-Zelllinie zu Myotuben wurden 6 h nach der Transfektion mit *Ebf*-Plasmiden (siehe 2.2.3.3.2) dem Vollmedium statt FKS 2 % Pferdeserum zugesetzt und täglich erneuert (nach Noh *et al.*, 2010).

#### **2.2.3.1.7 Kultivierung von embryonalen Fibroblastenzellen**

Um den Verlust der Pluripotenz von ES-Zellen zu verhindern, werden sie auf einer Zellschicht von mitotisch inaktivierten EF-Zellen gehalten. Diese so genannten „feeder“-Zellen besitzen eine Vierfachresistenz gegen Neomycin (G418), 6-Thioguanin, Hygromycin und Puromycin (Tucker *et al.*, 1997) und wurden etwa alle 3 - 4 Tage passagiert. Für die Kultivierung von ES-Zellen wurden nur EF-Zellen verwendet, welche maximal dreimal expandiert worden waren.

#### **2.2.3.1.8 Mitotische Inaktivierung von embryonalen Fibroblastenzellen**

Die mitotische Inaktivierung der EF-Zellen erfolgt mit Hilfe des aus dem Pilz *Streptomyces caespitosus* stammenden Zellgiftes Mitomycin C. Weitere Zellteilungen werden durch diese Behandlung verhindert, da die beiden DNA-Stränge durch alkylierende Reaktionen kovalent quervernetzt werden.

Hierzu wurden die Zellen zunächst einmal mit DPBS gewaschen und anschließend mit Mitomycin C-haltigem (10 µg/ml) EF-Medium 2 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen, trypsinisiert und in geeigneter Dichte ( $2 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm Platte) auf Gelatine-beschichteten Platten ausplattiert.

#### **2.2.3.1.9 Kultivierung von embryonalen Stammzellen**

Da sie für die Generierung transgener Mäuse genutzt werden, muss bei der Kultivierung von ES-Zellen darauf geachtet werden, dass sie nicht differenzieren und damit ihre Pluripotenz verlieren. Daher werden die Zellen mit LIF im Medium auf EF-Zellen kultiviert. LIF im Medium wirkt einer möglichen Differenzierung der ES-Zellen entgegen (Smith *et al.*, 1988, Williams *et al.*, 1988). Möglichen Differenzierungsfaktoren aufgrund großer Zelldichte wurde entgegengewirkt, indem die Zellen alle 2-3 Tage gesplittet und erneut in einer Dichte von etwa  $1,9 \times 10^4$  Zellen je  $\text{cm}^2$  ausplattiert wurden.

Leukämie inhibierender Faktor (LIF): Das von LIF-CHO-Zellen (Genetic Institute Cambridge, Massachusetts, USA) sezernierte Cytokin LIF wurde von Millipore bezogen.

### 2.2.3.2 Generierung stabiler ES-Zell-Klone

#### 2.2.3.2.1 Transfektion

Je Transfektionsansatz wurden ca.  $0,7 \times 10^7$  ES-Zellen eingesetzt, welche zuvor mit DPBS gewaschen und anschließend in 700  $\mu$ l Transfektionspuffer (RPMI 1640 ohne Phenolred) aufgenommen wurden. Den Zellen wurden anschließend 30  $\mu$ g des mit Hilfe der *Cla*I-Restriktionsendonuklease linearisierten, über eine Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigten und in 100  $\mu$ l Transfektionspuffer gelösten *Targeting*-Vektors zugesetzt (2.1.8.2). Die DNA-Zellsuspension wurde anschließend in eine Elektroporationsküvette überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Elektroporation in einem Elektroporationssystem bei 230 mV und 500  $\mu$ F wurden die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend auf vier EF-Zell-beschichteten 10 cm Platten ausplattiert. Als Kontrolle der Viabilität der Zellen nach der Transfektion dienten zwei 5 cm Platten, auf welchen vor und nach der Transfektion  $1 \times 10^3$  dem Ansatz entnommene Zellen kultiviert wurden. Diese Zellen wurden parallel in Vollmedium kultiviert, bis die auf ihnen wachsenden Kolonien gut zu erkennen waren. Diese Kolonien wurden anschließend gezählt und so der Anteil der bei der Transfektion gestorbenen Zellen bestimmt.

#### 2.2.3.2.2 Selektion

Die erfolgreich transfizierten Zellen konnten durch die Nutzung der auf dem Vektor kodierten Neomycinresistenz durch Zugabe von G418-Sulfat zum Vollmedium selektiert werden. 36 h nach der Transfektion wurde mit dieser Selektion begonnen.

Selektionsmedium: Medium für ES-Zellen mit über drei Tage ansteigendem aktivem Geneticin (0,150 bis 0,170 mg/ml G418-Sulfat).

#### 2.2.3.2.3 Vereinzeln und Expandieren

Sieben Tage nach der Transfektion sind in der Regel auf den mit Geneticin behandelten Platten fast ausschließlich Kolonien mit G418-resistenten Zellen zu sehen, während auf der Kontrollplatte keine Klone mehr vorhanden sein sollten. Zum Vereinzeln der Klone wurden die Platten zweimal mit DPBS gewaschen und anschließend mit 10 ml DPBS überschichtet. Die einzelnen Kolonien wurden unter einem Stereomikroskop in einer Gegenstrom-Sterilbank mit Hilfe einer Pipette (p-200) in 25  $\mu$ l DPBS aufgenommen. Nachfolgend wurden die Kolonien jeweils in ein Loch einer 96-Loch-Platte (Rundboden) transferiert bei 37 °C trypsinisiert. Die Reaktion wurde nach 10 min mit 125  $\mu$ l Vollmedium gestoppt und die

Kolonien durch Pipettieren in Einzelzellsuspension gebracht. Anschließend wurden die Klone auf eine mit EF-Zellen beschichtete 96-Loch-Platte ausplattiert. Nach drei Tagen wurden die Zellen wiederum trypsinisiert und zu gleichen Teilen auf drei EF-Zell-beschichteten Platten verteilt. Nach drei weiteren Tagen hatten die Zellen in ca. 50 % der Löcher eine optimale Dichte erreicht. Der Zustand der Kolonien wurde protokolliert und anschließend eine der Platten eingefroren. Die zweite Platte wurde am darauf folgenden Tag eingefroren, um auch von den anderen Kolonien eine optimale Dichte der Zellen einfrieren zu können. Die Kolonien der dritten Platte wurden nach Trypsinierung auf zwei mit Gelatine behandelte 96-Loch-Platten aufgeteilt und nach Erreichen einer 100 %igen Konfluenz verwendet, um genomische DNA für die Analyse der Klone zu gewinnen.

Zur Injektion in Blastozysten werden die jeweiligen ES-Zell-Klone 6 Tage vor der Injektion auf EF-Zellen beschichteten 6 cm Platten aufgetaut und nach 3 Tagen auf 2 mit EF-Zellen beschichteten 6 cm Platten passagiert. Am Tag der Injektion werden die Zellen trypsinisiert und für 30 min bei 37° C auf eine mit Gelatine beschichtete 10 cm Platte ausplattiert. Der Überstand wird vorsichtig abgespült und die Zellen anschließend zentrifugiert und für die Injektion in frischem Vollmedium aufgenommen. Diese Prozedur dient dazu, um möglichst viele der EF-Zellen von den ES-Zellen zu trennen.

### **2.2.3.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen**

#### **2.2.3.3.1 Transfektion von HEK293T-Zellen mittels Polyethylenimin**

Am Vortag wurden die Zellen definiert ausplattiert ( $4 \times 10^5$  pro 6-Loch-Platte,  $7,5 \times 10^5$  pro 10 cm Schale). Unmittelbar vor der Transfektion wurde das alte Medium entfernt und durch 3 ml DMEM mit 1 % FKS pro 10 cm Schale ersetzt. Während die Zellen anschließend wieder im Brutschrank inkubiert wurden, erfolgte die Mischung von 10 µg der zu transfizierenden DNA in 300 µl OptiMEM mit 13 µl PEI (1 mg/ml) in 300 µl OptiMEM. Nach einer Inkubation der Lösung für 20 min bei Raumtemperatur wurde diese tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Nach 4-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Transfektionsmedium durch Vollmedium ersetzt. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Ernte der Zellen.

Transfektionen im 6-Loch-Platten-Format wurden in der Regel in gleicher Weise mit Reagenzien um den Faktor 3 verringert durchgeführt.

#### **2.2.3.3.2 Transfektion von adhärenenten Zellen mit Lipofectamin**

Am Vortag wurden die Zellen definiert ausplattiert ( $4 \times 10^5$  pro 6-well). Vor der Transfektion wurde das alte Medium abgesaugt und pro 6-well wurden 2 ml DMEM mit 1 % FKS den Zellen zugegeben. 5 µg der zu transfizierenden DNA und 5 µl Lipofectamine 2000 wurden jeweils mit 250 µl OptiMEM vermengt. Die Lösungen wurden nach einer 5 min Inkubation gut gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Mischung auf die Zellen pipettiert und die Platten geschwenkt. Am Tag darauf wurde das Transfektionsmedium durch Vollmedium ersetzt. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Ernte der Zellen.

#### **2.2.3.3.3 Transfektion von Ba/F3-Zellen**

Die Elektroporation von Ba/F3-Zellen wurde ausschließlich für Reporter-Assays genutzt. Je Transfektion wurden ca.  $1 \times 10^7$  Zellen eingesetzt, welche vorab dreimal mit DPBS gewaschen wurden und anschließend in 150 µl OptiMEM aufgenommen wurden. Anschließend wurden 20 µg des Überexpressionsvektors, 10 µg des Reporterkonstruktes und 2 µg *lacZ*-Reporterplasmid mit 150 µl OptiMEM gemischt (Plasmide siehe 2.1.8.1). In der Elektroporationsküvette wurden DNA-Mixtur und Zellsuspension gemischt und bei 320 mV und 975 µF elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 2 ml warmes Vollmedium in 6-Loch-Platten überführt. Nach 24 h wurden weitere 2 ml Vollmedium zu den Zellen pipettiert. Die Ernte der transfizierten Zellen erfolgte nach 48 h.

#### **2.2.3.4 Isolation von murinen Zellen**

##### **2.2.3.4.1 Isolation embryonaler Fibroblastenzellen**

Plug-positive pSV2neo, PEP-IL4 Weibchen, welche mit Balb/c Männchen verpaart wurden (Dr. Ralf Kühn, Institut für Entwicklungsbiologie, HMGU München) wurden am Tag E12,5 pc per Genickbruch abgetötet und die Embryonen präpariert. In Zusammenarbeit mit Katharina Zettl (HMGU München) wurden dem Torso die inneren Organe entnommen und dieser dreimal mit DPBS gewaschen, um das Blut zu entfernen. Anschließend wurde der Torso in einer 10 cm Platte auf Eis maximal 5 min lang mit einem Skalpell zerschnitten. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37° C in 10 ml Trypsin/DNase (0,2 mg/ml; Roche) wurden die Zellen mehrmals über ein 100 µm-Zellsieb und weitere 15 min in Trypsin vereinzelt. Nach dem Stoppen der Reaktion mit Vollmedium wurden die Zellen sedimentiert, zweimal gewaschen und mit Vollmedium inklusive Pen/Strep auf mit Gelatine-beschichteten

15 cm-Platten ausgesät. Das Medium wurde bis zum Einfrieren der Zellen in den folgenden 3 Tagen täglich erneuert.

Medium für EF-Zell-Isolation: Medium für EF-Zellen, 1 % Pen/Strep.

#### **2.2.3.4.2 Isolation primärer embryonaler Knochenzellen**

Zur Isolation primärer Osteoblasten wurden die Calvariae von zwei Embryonen (Stadium E18,5 pc) in 5 ml MEMalpha mit 0,1 % Kollagenase, 0,2 % Dispase für 10 min bei 37 °C überkopf-rotierend inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Reaktion in vier nacheinander folgenden Schritten je mit MEMalpha mit 0,1 % Kollagenase, 0,2 % Dispase wiederholt. Die Überstände der vier Fraktionen wurden auf Eis gesammelt, die Zellen sedimentiert, und in Vollmedium zur Kultivierung überführt.

Zur Gewinnung primärer *Ebf2*-exprimierender Osteoblasten und *Ebf3*-exprimierender Zellen aus dem Knochen wurden die Hinterbeine der Embryonen (Stadium E18,5 pc) isoliert und die Haut entfernt. Jedes Beinpaar wurde zuerst in 5 ml DMEM mit 0,1 % Kollagenase, 0,2 % Dispase für 20 min bei 37 °C überkopf-rotierend inkubiert, um das knochenumgebende Gewebe zu verdauen. Dieser Schritt wurde anschließend mit weiteren 2,5 ml DMEM-Kollagenase-Dispase-Gemisch wiederholt und jeweils der Überstand verworfen. Die freigelegten Hinterbeinknochen wurden nun mit DPBS gewaschen, halbiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Knochen nun in drei nacheinander folgenden Schritten jeweils mit 2,5 ml DMEM mit 0,1 % Kollagenase, 0,2 % Dispase versetzt, 30 min bei 37 °C rotierend inkubiert und die Überstände der drei Fraktionen auf Eis gesammelt. Abschließend wurden die Zellen über ein 100 µm Zellsieb von eventuellen Resten befreit, sedimentiert, und für Durchflusszytometrie (2.2.4) in 500 µl DPBS aufgenommen.

#### **2.2.3.4.3 Isolation muriner Zellen aus Knochenmark, Diaphragma, Milz und Thymus**

Von 6 - 8 Wochen alten Mäusen wurden die Hinterbeine, Diaphragma, Milz und Thymus präpariert. Femur und Tibia wurden durch Brechen des Knie- bzw. Fußgelenks in die entgegengesetzte Richtung freigelegt. Die Knochen wurden anschließend mit Hilfe einer Spritze inklusive einer 27G x 3/4''-Kanüle (0,4 x 20 mm) mit 10 ml DPBS gespült. Zum Erhalt einer Einzelzellsuspension wurde das aus dem Knochen gespülte Knochenmark einige Male pipettiert und über ein 100 µm Zellsieb in ein frisches Gefäß überführt.

Das Diaphragma wurde mechanisch mit Hilfe eines sterilen Einweg-Skalpells (Braun) zerkleinert und anschließend 30 min in DMEM mit 0,2 % Kollagenase überkopf-rotierend

inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend über ein 70 µm Zellsieb in ein frisches Gefäß überführt.

Die Zellen aus Milz und Thymus wurden jeweils in DPBS durch auf- und abpipettieren vereinzelt und anschließend über ein 70 µm Zellsieb in ein frisches Gefäß überführt.

Die in frische Gefäße überführten Zellen wurden anschließend sedimentiert und je nach Verwendungszweck resuspendiert.

## 2.2.4 Durchflusszytometrie

### 2.2.4.1 Analyse

Die Durchflusszytometrie dient der Analyse einer Vielzahl von Zellen. Hierzu werden mit Fluoreszenzmarkern gekoppelte monoklonale Antikörper verwendet, welche spezifisch an die Oberflächenmoleküle der Zellen binden. Bei der Analyse werden sowohl die Größe und die Granularität der Zellen durch das Vorwärtstreulicht (FSC) und das Seitwärtstreulicht (SSC), als auch die Emission der angeregten Fluoreszenzmarker erfasst.

Jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen wurden zuerst 20 min in DPBS mit einem Fc-Block Antikörper (Ratte Anti-Maus CD16/CD32, Fcγ III/II Rezeptor, Klon 2.4G2; BD Pharmingen) inkubiert, um mögliche unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren. Anschließend wurden sie in DPBS mit der jeweils gewünschten Kombination von Fluorophor-konjugierten oder biotinylierten monoklonalen Antikörpern für 30 min bei 4 °C im Dunkeln gefärbt. Streptavidin-PE diente als R-Phycoerythrin-gekoppelter Sekundärantikörper von Biotin-konjugierten Erstantikörpern. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen für die Analyse in DPBS aufgenommen. Zum Ausschluss toter Zellen, wurden diese durch kurz vor der Analyse zugegebenes Propidium-Iodid (PI, 0,01 ng/µl finale Konzentration in DPBS) gefärbt, da dieses Reagenz nur die Zellmembran toter Zellen durchdringen und in deren Nukleinsäuren interkalieren kann.

Alle Analysen wurden mit einem FACSCalibur durchgeführt und die Resultate mit der CELLQuestPro™ Software ausgewertet. Je Färbung wurden mindestens  $1,5 \times 10^4$  lebende Zellen (PI negativ) aufgenommen.

Folgende konjugierten Fluorophore wurden benutzt:

Name	Exzitation	Emission
FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)	495	519
PE (R-Phycoerythrin)	480; 565	578
PI (Propidium Iodid)	536	617

PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein)	490	675
APC (Allophycocyanin)	650	660
PerCP-Cy5.5 (Peridinin Chlorophyll Protein–Cyanin 5.5)	675	694

Zur Analyse von hämatopoetischen Stammzellen (LSK-Zellen: Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>cKit<sup>+</sup>; Lin, *Lineagemarker*) aus der Knochenmark-Zellsuspension wurden  $1,5 \times 10^7$  Zellen in 250 µl DPBS aufgenommen und mit folgenden Antikörpern gefärbt:

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
B220-FITC ( <i>Rat Anti-Mouse</i> CD45R; Klon RA3-6B2)	BD Biosciences	1:1500
CD4-FITC ( <i>Rat Anti-Mouse</i> CD4; Klon RM4-5)	BD Biosciences	1:1500
CD8-FITC ( <i>Rat Anti-Mouse</i> CD8a; Klon 53-6.7)	BD Biosciences	1:1500
Gr1-FITC ( <i>Rat Anti-Mouse</i> Ly-6G, -6C; Klon RB6-8C5)	BD Biosciences	1:1500
Mac1-FITC ( <i>Rat Anti-Mouse</i> CD11b; Klon M1/70)	BD Biosciences	1:1500
Ter119-FITC ( <i>Rat Anti-Mouse</i> Ly-76; Klon TER-119)	BD Biosciences	1:1500
Sca1-PE ( <i>Rat Anti-Mouse</i> Ly-6A/E; Klon D7)	BD Biosciences	1:1500
cKit-APC ( <i>Anti-Mouse</i> CD117; Klon 2B8)	eBioscience	1:1500

Zur Analyse der Zusammensetzung von Knochenmark, Milz und Thymus wurden je  $1 \times 10^7$  Zellen in 500 µl DPBS aufgenommen und mit folgenden Antikörper-Kombinationen gefärbt:

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Erythrozyten/Stammzellen, Progenitorzellen (Knochenmark)		
Ter119-FITC ( <i>Rat Anti-Mouse</i> Ly-76; Klon TER-119)	BD Biosciences	1:500
cKit-APC ( <i>Anti-Mouse</i> CD117; Klon 2B8)	eBioscience	1:1500

Makrophagen/Granulozyten (Knochenmark)		
Mac1-FITC ( <i>Rat Anti-Mouse</i> CD11b; Klon M1/70)	BD Biosciences	1:500
Gr1-PE ( <i>Rat Anti-Mouse</i> Ly-6G, Ly-6C; Klon RB6-8C5)	BD Biosciences	1:500

B-Zellen (Knochenmark)		
B220-FITC ( <i>Rat Anti-Mouse</i> CD45R; Klon RA3-6B2)	BD Biosciences	1:500
CD19-Biotin ( <i>Rat Anti-Mouse</i> CD19; Klon MB19-1)	eBioscience	1:500
Streptavidin-PE ( <i>Anti-Rat</i> Streptavidin)	BD Biosciences	1:500

---

B-Zellen (Milz)		
IgM-APC ( <i>Anti-Mouse</i> IgM; Klon II/41)	eBioscience	1:250
IgD-Biotin ( <i>Rat Anti-Mouse</i> IgD; Klon 11-26)	eBioscience	1:500
Streptavidin-PE ( <i>Anti-Rat</i> Streptavidin)	BD Biosciences	1:500
T-Zellen (Thymus)		
CD4-FITC ( <i>Rat Anti-Mouse</i> CD4; Klon RM4-5)	BD Biosciences	1:500
CD8-Biotin ( <i>Rat Anti-Mouse</i> CD19; Klon 53-6.7)	eBioscience	1:750
Streptavidin-PE ( <i>Anti-Rat</i> Streptavidin)	BD Biosciences	1:500

Zur Analyse von Knochenmark und fötaler Leber der *Ebf3<sup>+/+</sup>*, *Ebf3<sup>+/-</sup>* und *Ebf3<sup>-/-</sup>* Tiere wurden je  $1 \times 10^7$  Zellen dem FDG-loading unterzogen (2.2.4.2) und anschließend in 500 µl DPBS aufgenommen und mit dem CD45-Antikörper gefärbt:

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
CD45.2-APC ( <i>Rat Anti-Mouse</i> CD117; Klon 104)	eBioscience	1:3500

#### 2.2.4.2 Sortierung von Zellen

*Ebf2-Gfp* exprimierende Osteoblasten wurden in einem Volumen von 500 µl DPBS mittels Durchflußzytometrie (FACS Aria, FACSDiva Software) sortiert (Propidium Iodid-negativ, Fluoreszeinisothiocyanat-positiv).

Die *Ebf3-lacZ* exprimierenden Zellen wurden in einem Volumen von 200 µl einem so genannten FDG (Fluorescein-di-β-D-Galaktopyranosid)-loading mittels hypotonischem Schock unterzogen. Hierzu wurden sie in DPBS mit 1 % FKS und 1mM FDG (finale Konzentration; Invitrogen) für 75 sec bei 37° C inkubiert und anschließend in 10 ml eiskaltem DPBS sedimentiert). Die Zellen wurden nachfolgend in einem Volumen von 500 µl DPBS sortiert (Propidium Iodid-negativ, Fluoreszeinisothiocyanat-positiv).

Um aus Milz, Thymus und Knochenmark (siehe 2.2.3.4.3) jeweils positive und negative Fraktion für CD45 oder B220 zu sortieren, wurden  $2 \times 10^7$  Zellen in 500 µl DPBS aufgenommen und mit einem der folgenden Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert:

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
B220-FITC ( <i>Rat Anti-Mouse</i> CD45R; Klon RA3-6B2)	BD Biosciences	1:500
CD45.2-APC ( <i>Rat Anti-Mouse</i> CD117; Klon 104)	eBioscience	1:3500



Anschließend wurden die Proben wie unter 2.2.4.1 beschrieben gewaschen und in DPBS aufgenommen.

## **2.2.5 Arbeiten mit Mäusen**

### **2.2.5.1 Isolation von Embryonen**

Am gewünschten Tag E7,5 bis E18,5 pc wurden die Embryonen aus dem Plug-positiven Muttertier präpariert. Je nach Versuch wurden die Embryonen anschließend nach Tötung in Trizol (Gesamt-RNA-Isolation) oder für *in situ* Hybridisierungen in 4 % PFA (DEPC-Wasser) eingelagert oder ihre Organe präpariert.

### **2.2.5.2 Isolation des Diaphragmas für immunhistologische Untersuchungen**

Um histologische Untersuchung des Diaphragmas zu ermöglichen, wurden die Embryonen am Tag E18.5 pc aus dem Muttertier präpariert oder die Geburt abgewartet. Bis zum Tod des ersten Embryos bzw. Babys, maximal jedoch 2 h wurden die Embryonen bzw. Babys bei 38 °C warm gehalten. Nach dem Abtöten wurde das Zwerchfell durch intra-peritoneale und intra-pectorale Injektion einer Fixierlösung (2,5 % PFA 2 % Glutaraldehyd, Sörens-Puffer, pH 7,4) und anschließende Lagerung bei 4 °C für 1 Stunde fixiert. Anschließend wurde das Diaphragma präpariert und in 2,5 % Glutaraldehyd (in Sörens-Puffer, pH 7,4) über Nacht bei 4 °C weiter fixiert. Die weiterführenden histologischen Analysen (Hämatoxylin-Eosin-Färbung longitudinaler Paraffinschnitte und Elektronenmikroskop, siehe 2.2.2.3) wurden durch Dr. Tanja Klein-Rodewald am Institut für Pathologie (HMGU München) durchgeführt.

### **2.2.5.3 De-Hydrierung und Paraffineinbettung von Embryonen**

Embryonen wurden aus dem Muttertier präpariert und abgetötet (siehe auch 2.2.5.1) und anschließend für 24 h in 4 % PFA (DEPC-Wasser) bei 4° C fixiert. Anschließend wurden die Embryonen über 8 Tage mittels ansteigender Ethanolreihe (30 % bis 98 %, je mit DEPC-Wasser) jeweils für 24 h bei 4° C dehydriert.

Um die Embryonen in Paraffin einbetten zu können, wurden sie zweimal für 1 h bei Raumtemperatur in RotiHistol® (Roth) und anschließend für eine weitere Stunde bei 65 °C in einem 1:2 Gemisch aus RotiHistol® und flüssigem Paraffin (Tyco) inkubiert. Nach einer über-Nacht-Inkubation in flüssigem Paraffin bei 65 °C wurden die Embryonen frischem Paraffin auf Trockeneis eingebettet, um eine schnelle Aushärtung des Paraffins zu gewähren.

Die 8 µm dicken Paraffinschnitte wurden mittels Rotationsmikrotom und einem Wasserbad (37 °C) auf Objektträger (Menzel GmbH und Co KG, Braunschweig) gebracht und abschließend auf 4 °C abgekühlt.

### **2.2.6 Statistik und Kalkulationen**

Analysen wurden, soweit nicht abweichend angegeben, in mindestens 3 unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt. Quantitative Real-Time PCR-Analysen wurden pro Replikat mindestens als technisches Duplikat, Luziferase-Galaktosidase-Tests als technisches Duplikat gemessen. In den Diagrammen wurden die in dem Programm Microsoft Excel ermittelten Mittelwerte und Fehlerbalken (SDM, *standard deviation of the mean*, Standardabweichung der Mittelwerte) aller Messungen gezeigt. Die Kalkulation der Signifikanzwerte wurde in dem Programm Microsoft Excel als zweiseitiger t-Test mit ungleicher Varianz im Vergleich zu der angegebenen Kontrolle durchgeführt und bei  $p < 0,0001$  bis  $p < 0,05$  als Stern/e gekennzeichnet. Nicht-signifikante Unterschiede wurden zur Vereinfachung nicht gesondert gekennzeichnet.

Durchflusszytometrie-Analysen, Western Blots und Gelbilder wurden exemplarisch dargestellt.

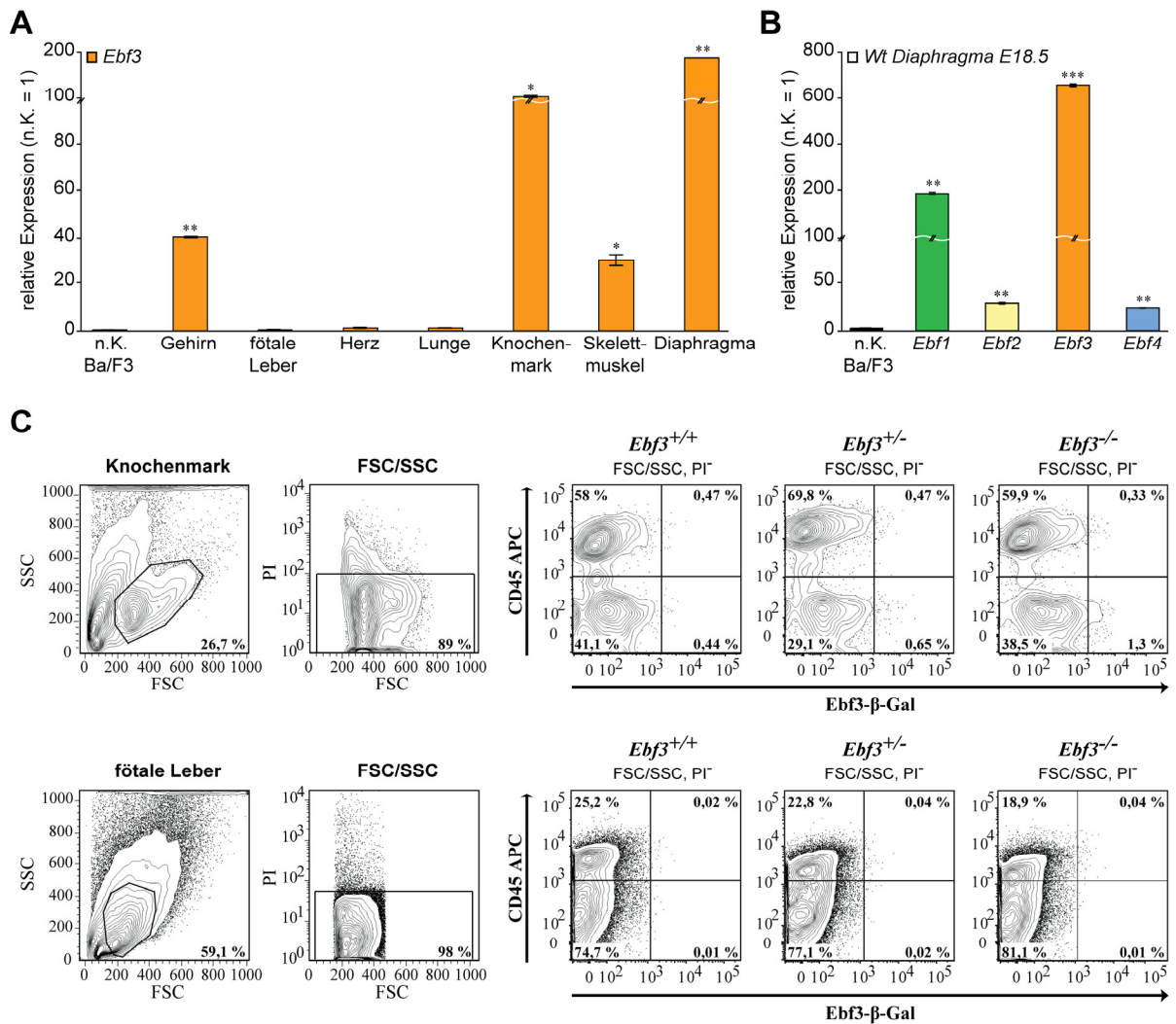
### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 *Atp2a1* ist ein Zielgen von Ebf3

##### 3.1.1 *Ebf3* ist in Muskelgeweben exprimiert

Die Deletion von *Ebf3* in *M. musculus* führt gemäß Wang *et al.* (2004) nach ca. 1- 2 Tagen zu einer postnatalen Letalität unbekannter Ursache. Mit Hilfe des bisher unpublizierten Tiermodells von M. Garcia-Dominguez und P. Charnay (Institut der Biologie, Ecole Normale Supérieure, Paris) konnte in unserem Labor ein fortschreitend zyanotischer Phänotyp mit Schnappatmung und Letalität ca. 10-20 min nach der Geburt beobachtet werden. Diesem könnte eine Dysorganisation von Knochen, Muskeln oder Lunge zu Grunde liegen. Um zu klären, welche der möglichen Gewebe *Ebf3* exprimieren und demnach zu der Fehlfunktion führen könnten, wurde eine quantitative Real-Time PCR mit den Gesamtzellen der jeweiligen Organe und Gewebe von Embryonen (E18.5 pc) durchgeführt. Hierzu wurden diese homogenisiert, die RNA isoliert und eine cDNA-Synthese durchgeführt (Abb. 3.1A). Hierbei konnte gezeigt werden, dass im Embryo in den untersuchten Geweben die höchste Expression von *Ebf3* im Diaphragma und im Knochen zu detektieren ist. Weiterhin konnte eine Expression in den Skelettmuskeln festgestellt werden. Konsistent mit den in Abb. 1.5C gezeigten Bildern der  $\beta$ -Gal-Färbung von Embryonen (E16.5 pc) konnte keine Expression in Herz, fötaler Leber und Lunge detektiert werden. Als Negativkontrolle und Normalisierungswert diente in diesen Experimenten die B-Zelllinie Ba/F3, da diese B-Zelllinie kein *Ebf3* exprimiert. Als Positivkontrolle diente Gesamtzellextrakt des Gehirns, da hier bereits die Expression von *Ebf3* publiziert wurde (Garel *et al.*, 1997).

Da die Expression von *Ebf3* gerade im Diaphragma sehr hoch war, sollte die Expression der anderen Ebf-Familienmitglieder ebenso ermittelt werden, um eine eventuelle Koexpression mit den anderen Faktoren herauszukristallisieren. So konnte im embryonalen Diaphragma eine hohe Expression von *Ebf1* und *Ebf3* sowie im Vergleich dazu eine um ein Vielfaches schwächere Expression von *Ebf2* und 4 auf mRNA-Ebene ermittelt werden (Abb. 3.1B). Als Negativ-Kontrolle diente hierbei die Zelllinie Ba/F3, da diese kein *Ebf2*, 3 und 4, und nur äußerst geringe Mengen an *Ebf1* exprimiert. Alle relativen Expressionen wurden auf die Expression des Referenzgens *Hprt* normalisiert, da diese in den murinen Geweben und Zellen in vorangegangenen Tests konsistenter als die Expression von  $\beta$ -Aktin und *Pbgd* war. Die Effizienz der Primerpaare für die Ebf-Faktoren wurde vorab mit Hilfe einer seriellen Verdünnung des Zieltranskripts ermittelt und anschließend in die Kalkulationen eingerechnet.



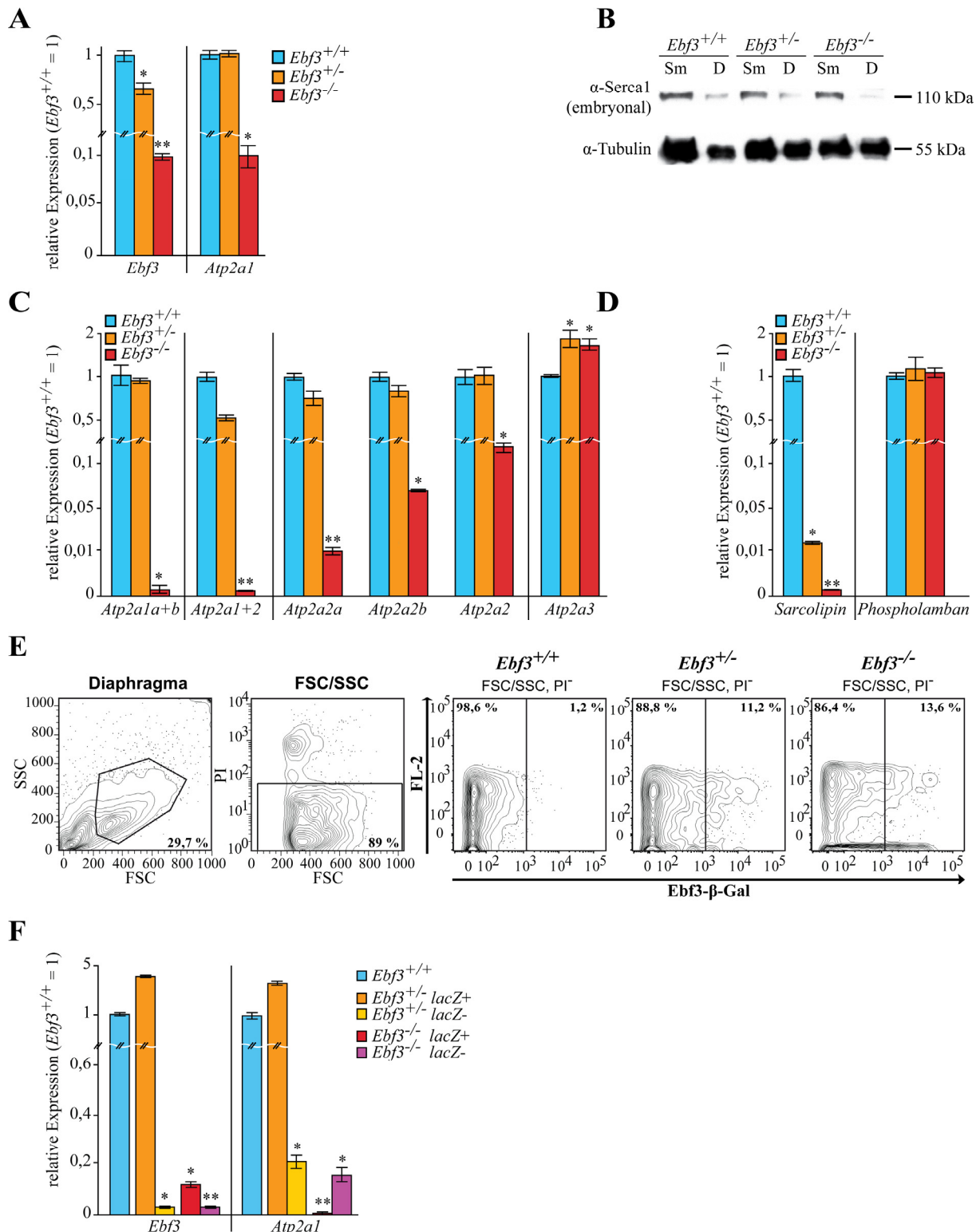
**Abb. 3.1 *Ebf3* ist im Embryo vor allem in Muskelgeweben, Knochenmark und Gehirn exprimiert.** Expressionsanalyse von Ebf-Faktoren in embryonalen Organen (E18.5 pc). **(A)** qRT-PCR diverser Wildtyp-Organen zur Analyse der *Ebf3*-Expression. n=3. **(B)** Expressionsanalyse aller Ebf-Faktoren im Wildtyp (Wt)-Diaphragma via qRT-PCR. n=3. **(C)** Repräsentative Durchflusszytometrie-Analyse der *CD45*- und *Ebf3-lacZ* (FDG)-Expression in Knochenmark und fötaler Leber. n=2. Die Expression der zu analysierenden Gene in qRT-PCR-Analysen wurde auf die Expression des Referenzgens *Hprt* normalisiert und relativ zu einer Kontrolle (n.K. Ba/F3) kalkuliert. Dargestellt wurden die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Standardabweichung (SDM). Signifikanzwerte wurden im Vergleich zur Kontrolle ermittelt und mit Sternen gekennzeichnet. \* $p < 0,01$  \*\* $< 0,005$  \*\*\* $< 0,0001$ .

Als nächstes sollte eine eventuelle Rolle von *Ebf3* in der Entwicklung von hämatopoetischen Zellen ermittelt werden. Hierzu wurden die Knochen einer Kollagenase-Dispase-Behandlung unterzogen und anschließend die vereinzelt Zellen von Knochenmark und fötaler Leber hinsichtlich ihrer *Ebf3-lacZ*- (FDG) und *CD45*-Expression untersucht (Abb. 3.1C). So konnten keine FDG-positiven Zellen in der fötalen Leber detektiert werden, was wiederum den in Abb. 1.5C gezeigten Bildern von Embryonen, wie auch den Expressionsstudien (Abb. 3.1A) entspricht. Im Knochenmark war die Expression von *Ebf3-lacZ* ausschließlich in *CD45*<sup>+</sup>-Zellen zu detektieren: 0,6 % ( $\pm 0,2$  %; heterozygote Tiere) und 0,9 % ( $\pm 0,4$  %; homozygote Tiere) der Zellen waren positiv.

### 3.1.2 Die Expression von *Atp2a1* in Muskelzellen ist von der Expression von *Ebf3* abhängig

Da der Phänotyp der Deletion von *Ebf3* dem Deletions-Phänotyp von *Atp2a1* sehr ähnlich ist (siehe 1.2.5) und *Ebf3* hoch in Skelettmuskeln und Diaphragma exprimiert ist, sollte untersucht werden, ob *Atp2a1* ein Zielgen von Ebf3 ist. Hierzu wurden die Diaphragmen von *Ebf3*<sup>+/+</sup>, *Ebf3*<sup>+/-</sup> und *Ebf3*<sup>-/-</sup>-Tieren isoliert, homogenisiert und aus der Gesamt-RNA eine cDNA-Synthese durchgeführt. Mit dieser wurde per quantitativer Real-Time PCR die Expression von *Ebf3* und *Atp2a1* untersucht. Die Expression von *Ebf3* in den homozygoten Deletionstieren war im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren signifikant reduziert. Zudem konnte eine 10-fache Reduktion von *Atp2a1* detektiert werden (Abb. 3.2A). Um diese Ergebnisse auch auf Protein-Ebene zu analysieren, wurde ein Western Blot mit Protein-Extrakten aus den Diaphragmen und den Skelettmuskeln der Beine durchgeführt. Hier konnte ebenso eine Reduktion von *Serca1* im Diaphragma detektiert werden (Abb. 3.2B). Die Proteinmenge von *Serca1* im Skelettmuskel schien dagegen nicht beeinträchtigt zu sein. Mit dem anti-Pan-Ebf-Antikörper konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), da dieser Antikörper alle Ebf-Proteine gleichermaßen erkennt (Antikörper im Zusammenhang mit Ebf2 in Kieslinger *et al.*, 2010 veröffentlicht) und wie in dieser Arbeit gezeigt, alle Ebf-Proteine in Diaphragma und Skelettmuskel exprimiert waren (Abb. 3.1 und Abb. 3.11).

Weiterhin wurde mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht, inwieweit die einzelnen Spleiß- und Gen-Varianten von *Atp2a* durch die Deletion von *Ebf3* beeinflusst werden. Als Orientierungshilfe und zum Zweck der Vergleichbarkeit wurden alle in der Beschreibung der *Atp2a1*-defizienten Tiere untersuchten Gene analysiert (Pan *et al.*, 2003) und die darin verwendeten Primer benutzt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass bis auf *Atp2a3*, welches im Gegensatz zur Expression der anderen *Atp2a*-Varianten schon im heterozygoten Tier hochreguliert wurde, alle hier untersuchten Varianten signifikant reduziert waren (Abb. 3.2C). Da *Sarcolipin* die Aktivität von *Atp2a* in Skelettmuskeln einschließlich des Diaphragmas, und *Phospholamban* in der Herzmuskulatur reguliert (siehe 1.2.4), wurde auch die Expression dieser Gene in den embryonalen Diaphragmen analysiert. Während die Expression von *Phospholamban* in allen Genotypen unverändert war, konnte eine drastische Reduktion von *Sarcolipin* schon im heterozygoten Zustand festgestellt werden (Abb. 3.2C).



**Abb. 3. 2 Ebf3 reguliert die Expression von *Atp2a1* im embryonalen Diaphragma.**

Analysen von embryonalen Diaphragmen (E18.5 pc) aller Genotypen via qRT-PCR (A, C, D, F), Western Blot (B) und Durchflusszytometrie (E). (A) Expressionsanalyse von *Ebf3* und *Atp2a1*. n=3. \*p<0,04 \*\*<0,002. (B) Western Blot-Analyse von Protein-Extrakten aus Skelettmuskeln (Sm) und Diaphragmen (D) unter Nutzung des anti-Serca1 (embryonal)-Antikörpers und anti- $\beta$ -Tubulin als Ladekontrolle. n=1. (C) Analyse der Expression von verschiedenen *Atp2a*-Speißvarianten und (D) von *Sarcolipin* und *Phospholamban*. n=3. \*p<0,03 \*\*<0,004. (E) Repräsentatives Sortierungs-Schema von FDG $\pm$  Zellen (*Ebf3*<sup>+/+</sup>). n=3. (F) Sortierte Zellen (*Ebf3*<sup>+/+</sup> und *Ebf3*<sup>-/-</sup> *lacZ*<sup>+</sup> und *Ebf3*<sup>-/-</sup> *lacZ*<sup>-</sup>) des Diaphragmas bzw. als Kontrolle unsortierte *Ebf3*<sup>+/+</sup> Diaphragma-Zellen wurden bezüglich der Expression von *Ebf3*-*lacZ* und *Atp2a1* analysiert. n=3. \*p<0,04 \*\*0,004. Die Expression der zu analysierenden Gene wurde auf die Expression des Referenzgens *Hprt* normalisiert und relativ zur Kontrolle

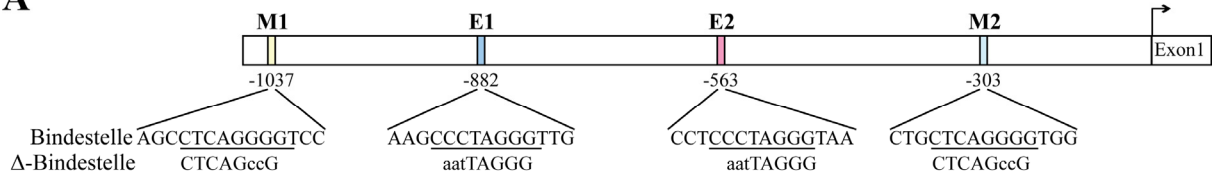
(*Ebf3*<sup>+/+</sup>) ermittelt. Dargestellt wurden die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Standardabweichung (SDM). Signifikanzwerte wurden im Vergleich zur Kontrolle kalkuliert und mit Sternen gekennzeichnet.

Um die Expression von *Atp2a1* im Weiteren zu analysieren, sollten die Zellen der Diaphragmen detaillierter untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen mittels Kollagenase-Behandlung vereinzelt und mit Hilfe von FDG ihre *Ebf3-lacZ*-Expression überprüft. Da nur ca. 9 % der Zellen positiv bezüglich der Expression waren, sollte ermittelt werden, auf welche Zellen die Reduktion von *Atp2a1* zurück zu führen sein könnte. Hierzu wurden mittels Durchflusszytometrie alle intakten Zellen vorab nach FSC und SSC ausgewählt. Die lebenden Zellen (PI<sup>-</sup>) wurden anschließend nach ihrer *Ebf3*-β-Gal (FDG)-Aktivität als positive und negative Zellen sortiert. Ein repräsentatives Schema der Sortierung wurde in Abb. 3.2E gezeigt. So konnte bei den heterozygoten und homozygoten *Ebf3*-Diaphragmen ein Prozentsatz von 12,5 % (±1,9 %) an *FDG*<sup>+</sup>-Zellen sortiert werden.

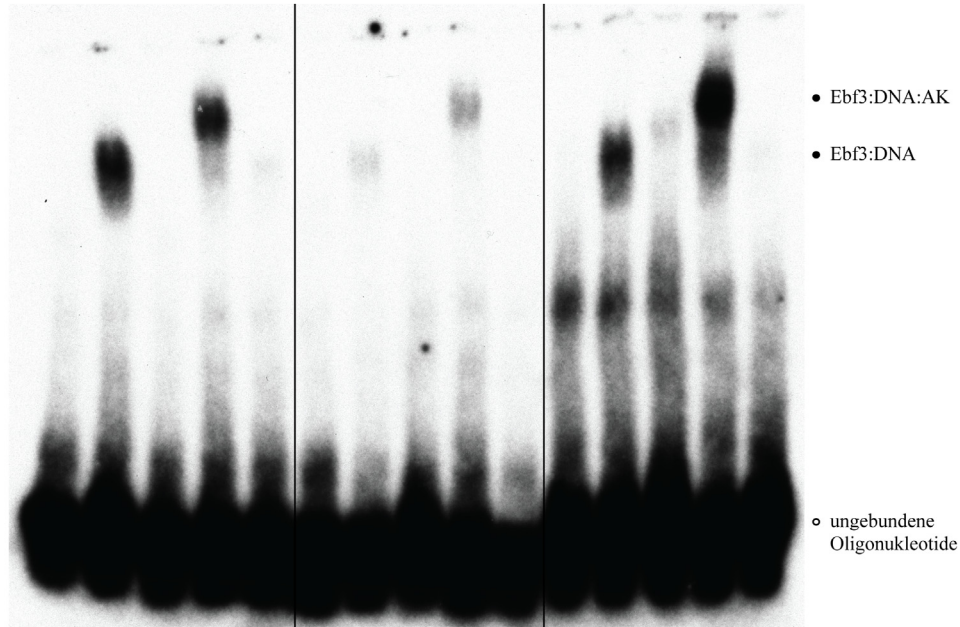
Aus den sortierten Zellen wurde Gesamt-RNA gewonnen und nach der cDNA-Synthese eine quantitative Real-Time PCR-Analyse durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass *Atp2a1* in den *Ebf3-lacZ*<sup>+</sup>-Zellen (siehe *Ebf3*<sup>+/+</sup>) angereichert war und die drastische Reduktion im Gesamt-Diaphragma auf die Reduktion der *Ebf3*-Expression in eben diesen Zellen zurück zu führen war (siehe *Ebf3*<sup>-/-</sup>, Abb. 3.2F).

Demnach könnte *Atp2a1* im Diaphragma von Ebf3 direkt oder indirekt reguliert werden. Der nächste Schritt war, die Promotorregion des Gens näher zu untersuchen. Bei der Analyse des *Atp2a1*-Promotors konnten durch Dr. Petra Kopp und Dr. Matthias Kieslinger (beide HMGU München) vier potentielle Ebf-Bindestellen identifiziert werden. Zwei davon entsprachen dabei zumindest im inneren Palindrom der typischen Ebf1-Bindestelle (E1, E2, siehe 1.1.1; Travis *et al.*, 1993; Hagman *et al.*, 1993; 1995), die anderen beiden dem inneren Palindrom der typischen Ebf1-Bindestelle des *Mb1*-Promotors (M1, M2; Abb. 3.3A; Travis *et al.*, 1991). So sollte im Folgenden sowohl die Bindungsfähigkeit als auch die Transaktivierungsfähigkeit von Ebf3 bezüglich jeder einzelner dieser Bindestellen untersucht werden. Hierzu wurden einzelne und kombinierte Bindestellenmutationen durchgeführt, so dass die Promotorsequenz zwischen ein und vier funktionelle Bindestellen besaß. Die in dem Schema der Abb. 3.3A skizzierten Mutationen wurden nach Zhao *et al.*, 2006 (M1, 2) und Travis *et al.*, 1993 (E1, 2) durchgeführt.

**A**

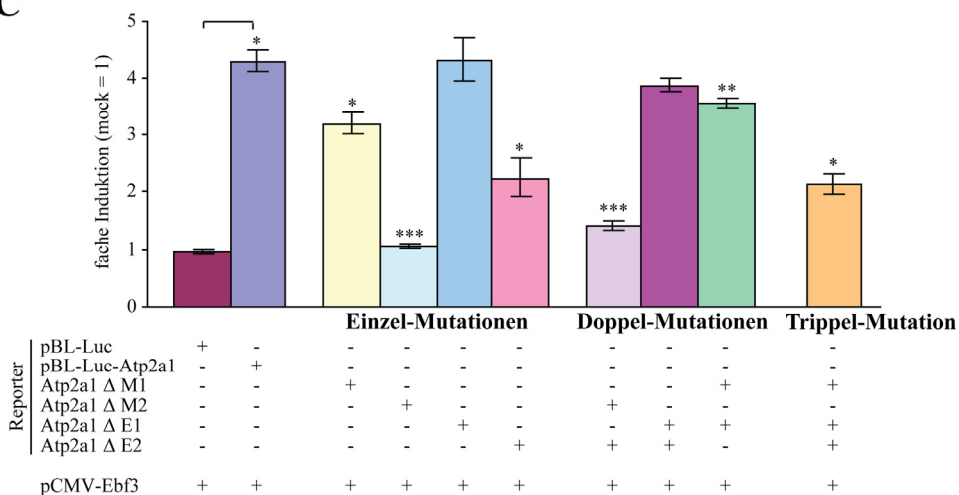


**B**



	M1-Bindestelle					E1-Bindestelle					E2-Bindestelle				
mock-Flag	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ebf3-Flag	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M1-Oligo	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E1-Oligo	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
E2-Oligo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
ΔM1-Oligo	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ΔE1-Oligo	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ΔE2-Oligo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
α-Flag	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
kalte Oligo	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+

**C**



**Abb. 3. 3 Ebf3 ist in der Lage, an den *Atp2a1*-Promotor zu binden und ihn zu transaktivieren.**

(A) Schema der potentiellen Ebf-Bindestellen und der verwendeten Mutationen (Δ, kleine Buchstaben) im *Atp2a1*-Promotor. M, Palindrom, welches der Ebf-Bindestelle im *Mb1*-Promotor entspricht, Mutation nach Zhao *et al.*, 2006; E, der Bindestelle für Ebf-Faktoren entsprechende Konsensussequenz, Mutation nach Travis *et al.*, 1993. (B) EMSA zur Analyse der Bindungsfähigkeit von Ebf3 an die potentiellen Bindestellen des *Atp2a1*-Promotors. Ebf3:DNA:AK, *Supershift* durch Zugabe des anti-Flag-Antikörpers Ebf3:DNA; Bindung von Protein



und Oligonukleotiden; Oligo, Oligonukleotid;  $\Delta$ , Bindestellenmutation. n=3. (C) Reporter-Analyse der Transaktivierung des *Atp2a1*-Promotors durch Ebf3. Neben dem Promotor mit vier intakten Bindestellen wurde die Auswirkung einer Bindestellenmutation ( $\Delta$ ) einzeln sowie in Kombination untersucht. Die Induktion der Transaktivierung wurde, wenn nicht anders vermerkt, auf die Induktion der kotransfizierten  $\beta$ -Galaktosidase normalisiert und relativ zur Transaktivierung des unmutierten *Atp2a1*-Promotors (pBL-Luc-*Atp2a1*) errechnet. Dargestellt wurden die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Standardabweichung (SDM). Ermittelte Signifikanzwerte wurden, wenn nicht anders angegeben, zur Transaktivierung der unmutierten *Atp2a1*-Promotorsequenz (lila) ermittelt. n=3. \*p<0,05 \*\*<0,005 \*\*\*<0,0008.

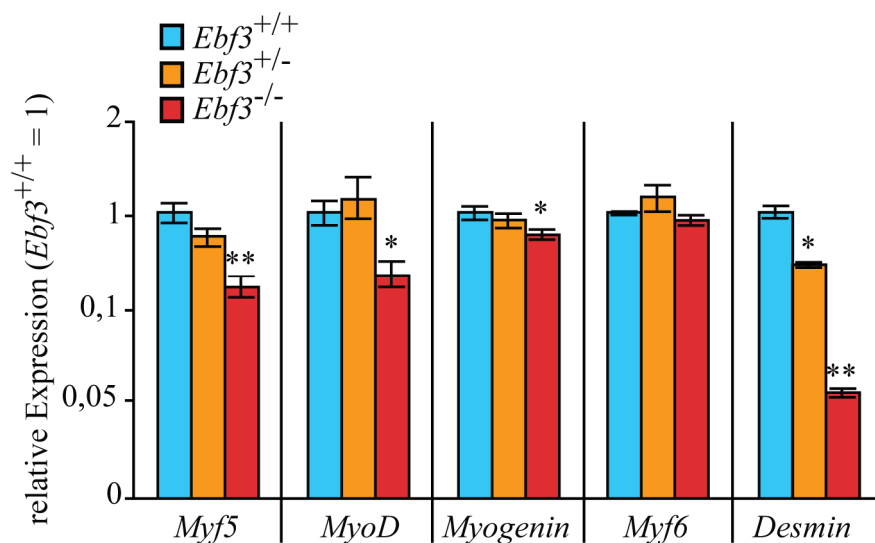
Das für den EMSA in HEK293T-Zellen überexprimierte, mit Flag-Tag versehene Ebf3-Protein wurde hierzu gemeinsam mit den Oligonukleotiden M1, E1 und E2, bzw. ihren mittels punktgerichteter Mutagenese mutierten Variationen (siehe 2.1.10.4) und einem anti-Flag-Antikörper auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen und ihrer Komplexgröße nach getrennt. So konnte die Bindung von Ebf3 an die Oligonukleotide der Bindestellen M1, E1 und E2 bestätigt und mit Hilfe der mutierten und der kalten Oligonukleotide spezifiziert werden. Auch der *Supershift*-Komplex aus DNA, Protein und Antikörper konnte mittels anti-Flag-Antikörper gezeigt werden (Abb. 3.3B). Aufgrund der Signalstärke könnte die Bindung von Ebf3 an die Bindestellen M1 und E2 wichtiger als die Bindung an E1 sein. Einzig die Bindung des Ebf3-Proteins an die Bindestelle M2 konnte bisher noch nicht im EMSA bestätigt werden.

Zur Klärung der Frage, ob Ebf3 in der Lage ist, den Promotor von *Atp2a1* an allen vier Bindestellen gleichermaßen zu transaktivieren, wurde ein Reporter-Assay durchgeführt. Hierzu wurden HEK293T-Zellen transient mit einem *Ebf3*-Expressionsplasmid und dem *Atp2a1*-Reporterplasmid transfiziert. Hierbei wurde nicht nur die unmutierte Promotorsequenz verwendet, sondern auch analog zu den im EMSA verwendeten Mutationen Sequenzen mit Einzel-Bindestellen-Mutationen. Weiterhin wurde die Kombination verschiedener Bindestellen-Mutationen untersucht. Die Werte wurden anhand der Expression der kotransfizierten und aktivierten  $\beta$ -Galaktosidase normalisiert und abzüglich der Werte der *mock*-Kontrolle (Leervektor; pBL-Luc) ermittelt. Hierbei konnte demonstriert werden, dass Ebf3 den *Atp2a1*-Promotor transaktivieren kann (Abb. 3.3C, zweiter Balken). Weiterhin konnte durch die Einzel-Bindestellen-Mutationen gezeigt werden, dass die Mutation von M2 zu einer drastischen Reduktion der Transaktivierung führte. Durch die Mutationen der Bindestellen M1 und E2 konnte zumindest eine Reduktion der Aktivität festgestellt werden, während die Mutation der Bindestelle E1 zu keinem Herabsetzen der Transaktivierung führte, was mit dem schwächeren Bindungssignal im EMSA in Übereinstimmung ist (Abb. 3.3B, C, Balken 3-6). Durch die Kombination der Mutationen konnte die Wichtigkeit der Bindestelle M2 nochmal bestätigt werden (Abb. 3.3C, Balken 7-9). Selbst durch die Kombination der

Mutationen von E1, E2 und M1 konnte keine so drastische Reduktion wie mit Hilfe der Einzel-Bindestellen-Mutation von M2 detektiert werden (Abb. 3.3C, Balken 10).

### 3.1.3 Die Deletion von *Ebf3* reduziert die Expression von wichtigen Muskel-Genen *in vivo*

*Ebf3* war, wie unter 3.1.1 erwähnt, hoch in Skelettmuskeln und Diaphragma exprimiert. Von daher sollte die Rolle von *Ebf3* in der Entwicklung der muskulären Zellen des Diaphragmas näher charakterisiert werden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind vor allem die MRF-Familienmitglieder *Myf5*, *MyoD*, *Myogenin* und *Myf6* essentiell für die Muskelentwicklung (1.2.2). Daher wurde die Expression dieser Muskelgene in den Diaphragmen von *Ebf3*<sup>+/+</sup>, *Ebf3*<sup>+/-</sup> und *Ebf3*<sup>-/-</sup>-Embryonen (E18.5 pc) untersucht (Abb. 3.4). In den Diaphragmen der *Ebf3*<sup>-/-</sup>-Tiere konnte eine signifikante Reduktion von *Myf5*, *MyoD* und *Myogenin* detektiert werden. Ebenso war die Expression des erst in Muskelfasern exprimierten *Desmin* stark divergent zwischen der Deletion und Wildtyp-*Ebf3*.



**Abb. 3. 4 *Ebf3* kann die Expression wichtiger Faktoren der Muskelzellendifferenzierung negativ beeinflussen.**

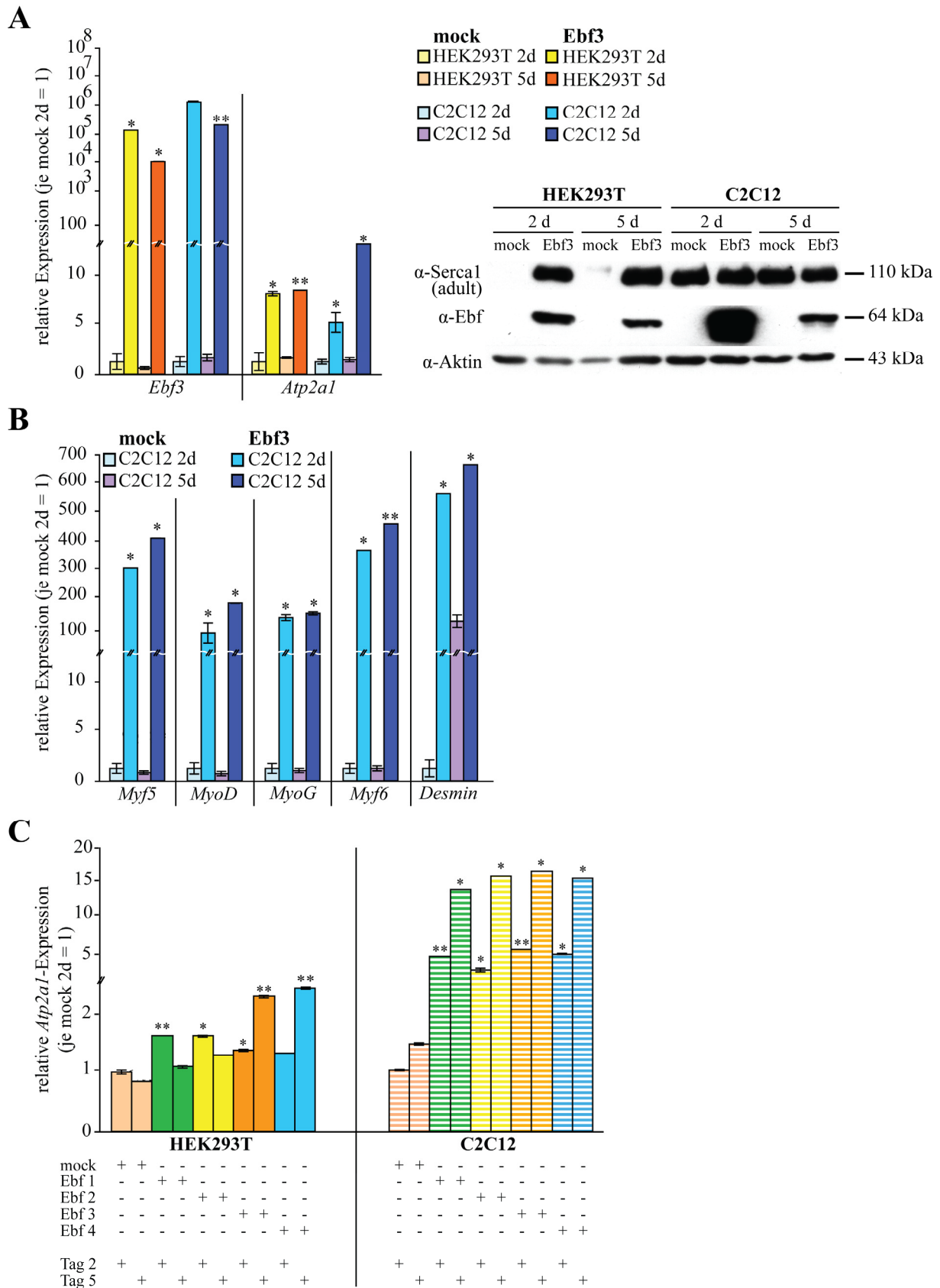
Analyse der Expression von MRF-Faktoren und *Desmin* in embryonalen Diaphragmen (E18.5 pc). Die Expression der zu analysierenden Gene wurde auf die Expression des Referenzgens *Hprt* normalisiert und relativ zur Kontrolle (*Ebf3*<sup>+/+</sup>) ermittelt. Dargestellt wurden die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Standardabweichung (SDM). Signifikanzwerte wurden im Vergleich zur Kontrolle kalkuliert und mit Sternen gekennzeichnet. n=3. \*p< 0,04 \*\*<0,01.

### 3.1.4 Ebf3 induziert die Expression von essentiellen Genen der Muskelentwicklung *in vitro*

Die bisher gezeigten Ergebnisse legten nahe, dass Ebf3 eine Rolle in der Muskelentwicklung spielen könnte. Für essentielle Muskelgene, den sogenannten MRF-Faktoren, konnte bereits gezeigt werden, dass diese in der Lage sind, *in vitro* das myogene Programm von nicht-muskulären Zellen zu induzieren (Taylor und Jones, 1979; Pownall *et al.*, 2002). Um zu überprüfen, ob Ebf3 *upstream* der Faktoren liegen könnte und damit ebenso in der Lage ist, das myogene Programm in Zellen zu initiieren, sollte eine *in vitro*-Differenzierung unter dem Einfluss einer *Ebf3*-Überexpression der prämyoblastischen Zelllinie C2C12 und der Epithelzell-Linie HEK293T durchgeführt werden (nach Noh *et al.*, 2010). In dieser Publikation wurden durch die Zugabe von Pferdeserum permissive Bedingungen geschaffen, welche die *in vitro*-Differenzierung von C2C12 erlaubten. Durch die ektopische Expression von *MyoD* konnte eine Differenzierung der Zellen zu Myotuben initiiert werden. Dieses Prozedere wurde in den nachfolgenden Experimenten eingehalten. Als Tag 0 (d 0) wurde der Tag der Transfektion der Expressionsplasmide und gleichzeitiger Zugabe von Pferdeserum gewählt. So konnte gezeigt werden, dass durch die Überexpression von *Ebf3* die Expression von *Atp2a1* in beiden Zelllinien am 2. und am 5. Tag der Differenzierung um ein Vielfaches anstieg (Abb. 3.5A links).

Im Western Blot wurde mit parallel isolierten Proteinen die Proteinmenge in den Zellen mit Hilfe der Antikörper anti-Serca1, anti-Pan-Ebf und zur Kontrolle anti- $\beta$ -Aktin analysiert. Wichtig zu erwähnen ist, dass der Kontroll-Antikörper anti- $\beta$ -Aktin zu hohem Maße kreuzreaktiv mit humanem  $\beta$ -Aktin ist und demnach auch eine geeignete Kontrolle der Proteingesamtmenge von HEK293T-Zellen darstellt. Der Antikörper anti-Serca1 erkannte in den hier durchgeführten Experimenten entgegen den Herstellerangaben auch das humane induzierte Serca1. Mit Hilfe des anti-Pan-Ebf-Antikörpers konnten dagegen nur durch ektopische Expression induzierte murine Ebf-Proteine detektiert werden.

In den Analysen wurde in Übereinstimmung der zunehmenden mRNA eine Induktion des Serca1-Proteins nach der Überexpression von *Ebf3* in HEK293T-Zellen beobachtet, während in den C2C12-Zellen keine Zunahme des Serca1-Proteins detektiert werden konnte (Abb. 3.5A rechts). Dieser Umstand könnte jedoch darauf zurück zu führen sein, dass die C2C12-Zelllinie bereits im untransfizierten und undifferenzierten Zustand das Protein zu einem eventuell gesättigten Grad exprimiert.



**Abb. 3. 5 Ebf3 induziert die Expression von *Atp2a1* und MRF-Genen.**

(A) *In vitro*-Differenzierung von HEK293T und C2C12-Zellen. Die Zellen wurden mit einer *mock*-Kontrolle oder *Ebf3* transfiziert, mit Pferdeserum im Vollmedium kultiviert, und nach 2 (2d) oder 5 (5d) Tagen auf ihre Expression von *Ebf3*, *Atp2a1* via qRT-PCR analysiert. Dargestellt wurden die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Standardabweichung (SDM). Rechts: repräsentativer Western Blot mit Hilfe des anti-Serca1-(adult) und anti-Pan-Ebf-Antikörpers. Als Ladekontrolle wurde ein anti-β-Aktin-Antikörper verwendet. n=3.

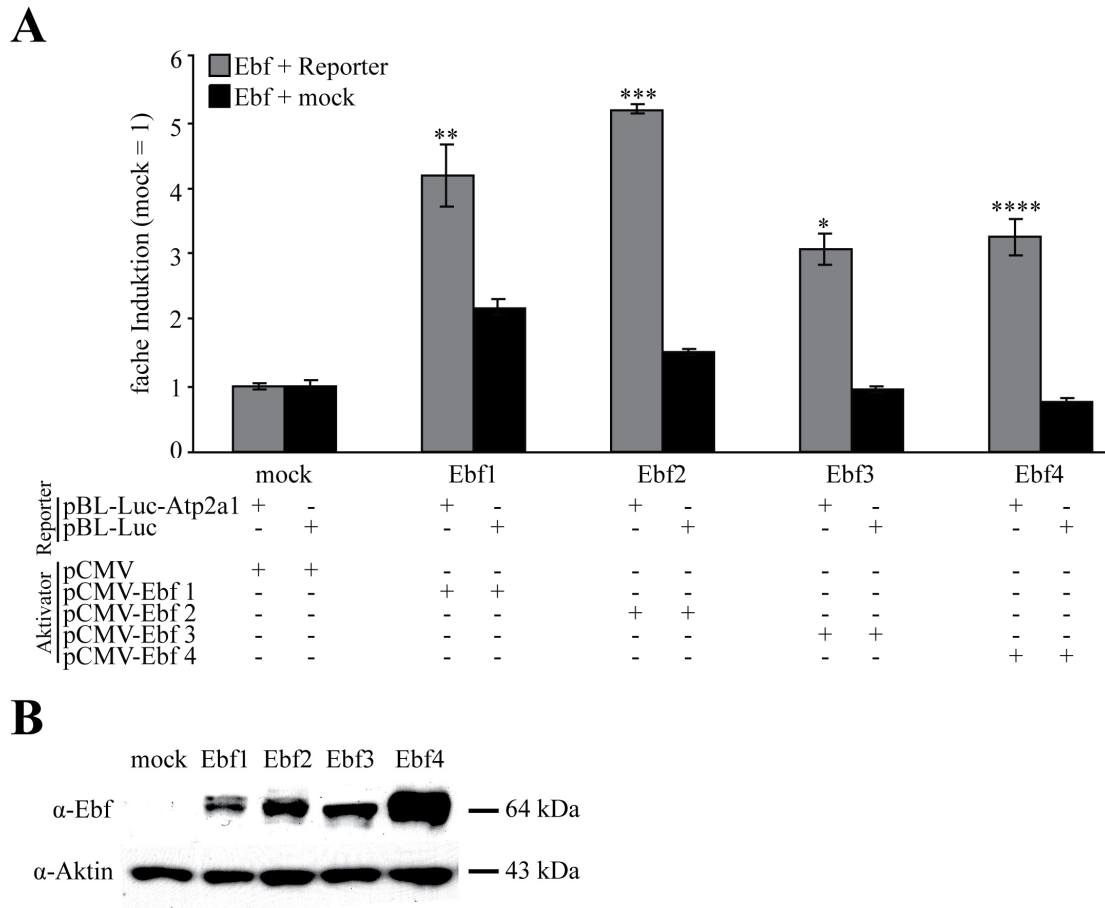
**(B)** Analyse der Expression verschiedener Muskelgenen von *in vitro*-differenzierten C2C12-Zellen (siehe A) mittels qRT-PCR. n=3. **(C)** *In vitro*-Differenzierung von HEK293T und C2C12-Zellen (siehe A) mit Expressionsplasmiden für *Ebf1*, 2, 3 und 4. Dargestellt wurden die Mittelwerte der technischen Replikate und die Standardabweichung (SDM) n=1. Die Expression der zu analysierenden Gene wurde auf die Expression des Referenzgens *Hprt* normalisiert und relativ zu einer Kontrolle (je Zelllinie *mock* 2d) ermittelt. Signifikanzwerte wurden im Vergleich zur Kontrolle kalkuliert und mit Sternen gekennzeichnet. \*p< 0,05 \*\*<0,005.

Ebenso konnte auf mRNA-Ebene eine erhöhte Expression aller hier untersuchten Muskelgene in den C2C12-Zellen ab dem 2. Tag der Differenzierung und nach ektopischer Expression von *Ebf3* detektiert werden (Abb. 3.5B). Zukünftig sollte die Expression der MRF-Gene ebenso in den HEK293T-Zellen, sowie auf Protein-Ebene analysiert werden.

Weiterhin wurde dieses *in vitro*-Differenzierungs-Experiment auf die Überexpression der anderen Ebf-Familienmitglieder ausgeweitet, da *Ebf1* ebenso stark wie *Ebf3* in embryonalen Diaphragmen exprimiert war. So konnte in einer ersten Analyse ein ähnlicher Effekt in der *in vitro*-Differenzierung von C2C12-Zellen, wie es mit *Ebf3* zu sehen war, auch mit den anderen Familienmitgliedern detektiert werden (Abb. 3.5C). Da dieses Experiment bisher nur einmal durchgeführt wurde, sollte es jedoch künftig wiederholt werden, um biologische Replikate zu erhalten.

Da demnach *in vitro* alle Ebf-Proteine in der Lage zu sein scheinen, die Expression von *Atp2a1* zu induzieren, wurde in einer Reporter-Analyse untersucht, ob alle Familienmitglieder die Aktivierung des *Atp2a1*-Promotors gleichermaßen vollziehen können. Hierzu wurden die *Ebf*-Expressionsplasmide einzeln mit einem *Atp2a1*-Reporterplasmid und einem *LacZ*-Plasmid in HEK293T-Zellen transient transfiziert. Normalisiert auf die Messwerte der  $\beta$ -Galaktosidase und abzüglich der Hintergrundaktivität, ermittelt durch die *mock*-Kontrolle, konnte gezeigt werden, dass alle vier Proteine in der Lage waren, den Promotor zu transaktivieren (Abb. 3.6A). Die Transfektionseffizienz wurde bisher in zwei Western Blot-Analysen überprüft und sollte künftig für das dritte biologische Replikat wiederholt werden, da in beiden bisherigen Analysen eine höhere Menge an Ebf4-Protein zu detektieren war, was die Vermutung offen lässt, dass Ebf4 eine noch geringere Kompetenz der Transaktivierung in der Reporter-Analyse besitzen könnte, als ermittelt wurde (Abb. 3.6B).

Somit kann davon ausgegangen werden, dass *Atp2a1* nicht nur von Ebf3, sondern auch den anderen Familienmitgliedern ein potentiell Zielgen sein könnte.



**Abb. 3. 6 Alle Ebf-Familienmitglieder können den *Atp2a1*-Promotor transaktivieren.**

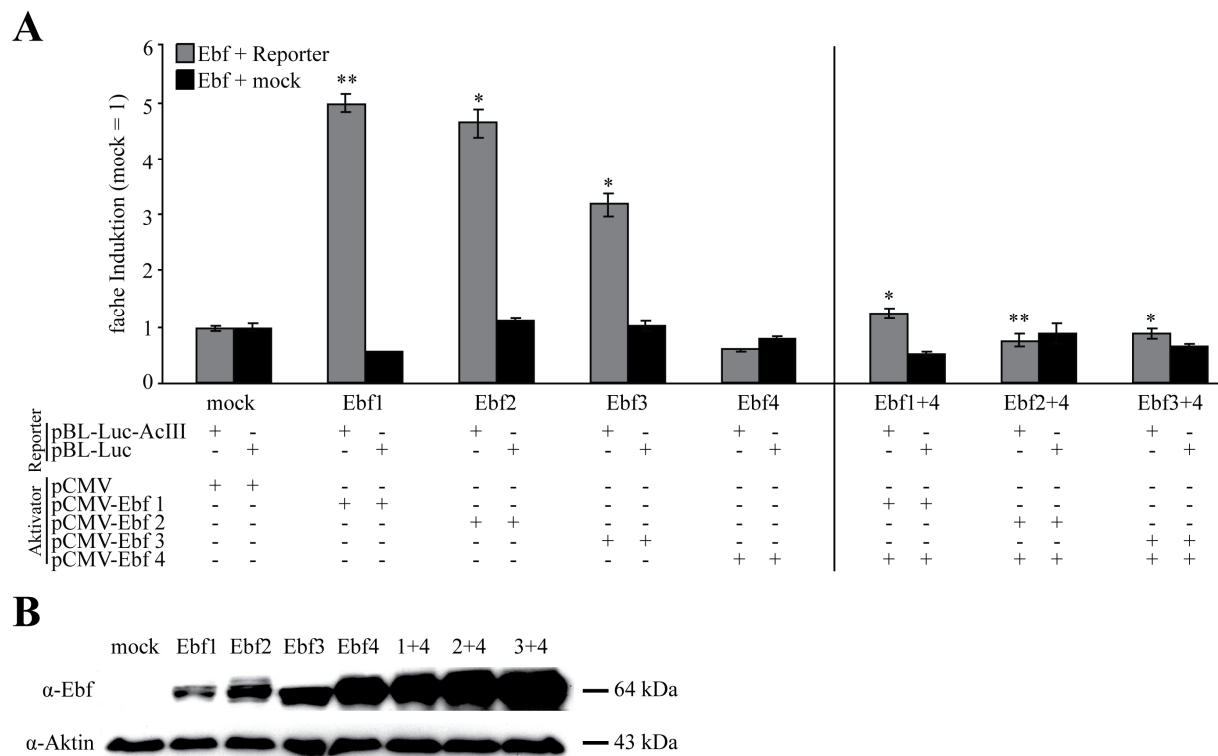
(A) Reporter-Analyse der Transaktivierung des *Atp2a1*-Promotors durch die Ebf-Faktoren. Die Induktion der Transaktivierung wurde auf die Induktion der kotransfizierten  $\beta$ -Galaktosidase normalisiert und relativ zur Kontrolle (*mock*: pCMV+, pBL-Luc-Atp2a1+) errechnet. Dargestellt wurden die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Standardabweichung (SDM). Signifikanzwerte wurden im Vergleich zur *mock*-Kontrolle des jeweiligen Faktors (pCMV-Ebf+, pBL-Luc+) kalkuliert und mit Sternen gekennzeichnet. n=3. \*p<0,004 \*\*<0,0005 \*\*\*<0,0003 \*\*\*\*<0,0001. (B) Repräsentativer Western Blot zur Überprüfung der Proteinmengen der Ebf-Faktoren mit Hilfe des anti-Pan-Ebf-Antikörpers. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. n=2.

## 3.2 Biochemische Aktivitäten von Ebf3 und Ebf4

### 3.2.1 Die transaktivierende Funktion von Ebf3 und Ebf4

Da Ebf4 ebenso wie die anderen Faktoren in der Lage war, den *Atp2a1*-Promotor zu transaktivieren, sollte als nächster Schritt anhand von Reporter-Studien überprüft werden, ob entsprechend der Hypothese von Wang *et al.* (2002) Ebf4 nur schwach transaktivieren und möglicherweise ein Negativ-Regulator der Transaktivierung der anderen Familienmitglieder sein könnte. So wurde die Transaktivierung der Ebf-Faktoren bezüglich des mit zehn Ebf-Bindestellen modifizierten, konkatemmerisierten *AcIII*-Promotors (Wang *et al.*, 1997; 2002) sowohl einzeln, als auch in Kombination mit Ebf4 untersucht. Mit Hilfe des *AcIII*-Reporterplasmids konnte in HEK293T-Zellen gezeigt werden, dass Ebf1, 2 und 3 eine starke transaktivierende Fähigkeit aufwiesen. Ebf4 dagegen zeigte keine signifikante Aktivität

(Abb. 3.7A links). In der Kombination mit Ebf4 wurde die Transaktivierung der anderen Familienmitglieder drastisch reduziert (Abb. 3.7A rechts). Die Transfektionseffizienz wurde jeweils in einem Western Blot überprüft. So konnte eine höhere Menge an Ebf4-Protein oder den Protein-Kombinationen detektiert werden, was die Vermutung zulässt, dass die tatsächliche Transaktivierung in der Reporter-Analyse noch geringer induziert sein könnte (Abb. 3.7B) Da alle Ebf-Proteine im Western Blot detektierbar waren, war der differentielle, durch Ebf4 vermittelte, Einfluss auf die Transaktivierung vermutlich nicht auf eine mögliche Deregulation der anderen Faktoren zurückzuführen.



**Abb. 3. 7 Ebf4 ist ein negativer Regulator der Transaktivierung des *AcIII*-Promotors.**

(A) Mittels Luziferase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Tests wurde die Transaktivierung des modifizierten *AcIII*-Promotors von Ebf1, 2, 3 und 4 in HEK293T-Zellen überprüft. Ebenso wurde die Kombination von Ebf4 mit den anderen Familienmitgliedern analysiert. Die Induktion der Transaktivierung wurde auf die Induktion der kotransfizierten  $\beta$ -Galaktosidase normalisiert und relativ zur Kontrolle (*mock*: pCMV+ pBL-Luc-AcIII+) errechnet. Dargestellt wurden die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Standardabweichung (SDM). Signifikanzwerte wurden im Vergleich zur *mock*-Kontrolle des jeweiligen Faktors (pCMV-Ebf+, pBL-Luc+), oder in der Kombination mit Ebf4 auf die Transaktivierung des jeweiligen Ebf (pCMV-Ebf1/2/3+, pBL-Luc-AcIII+) kalkuliert und mit Sternen gekennzeichnet. n=3. \*p<0,001 \*\*<0,0001. (B) Exemplarischer Western Blot unter Verwendung des anti-Pan-Ebf-Antikörpers und des anti- $\beta$ -Aktin-Antikörpers als Ladekontrolle. n=3.

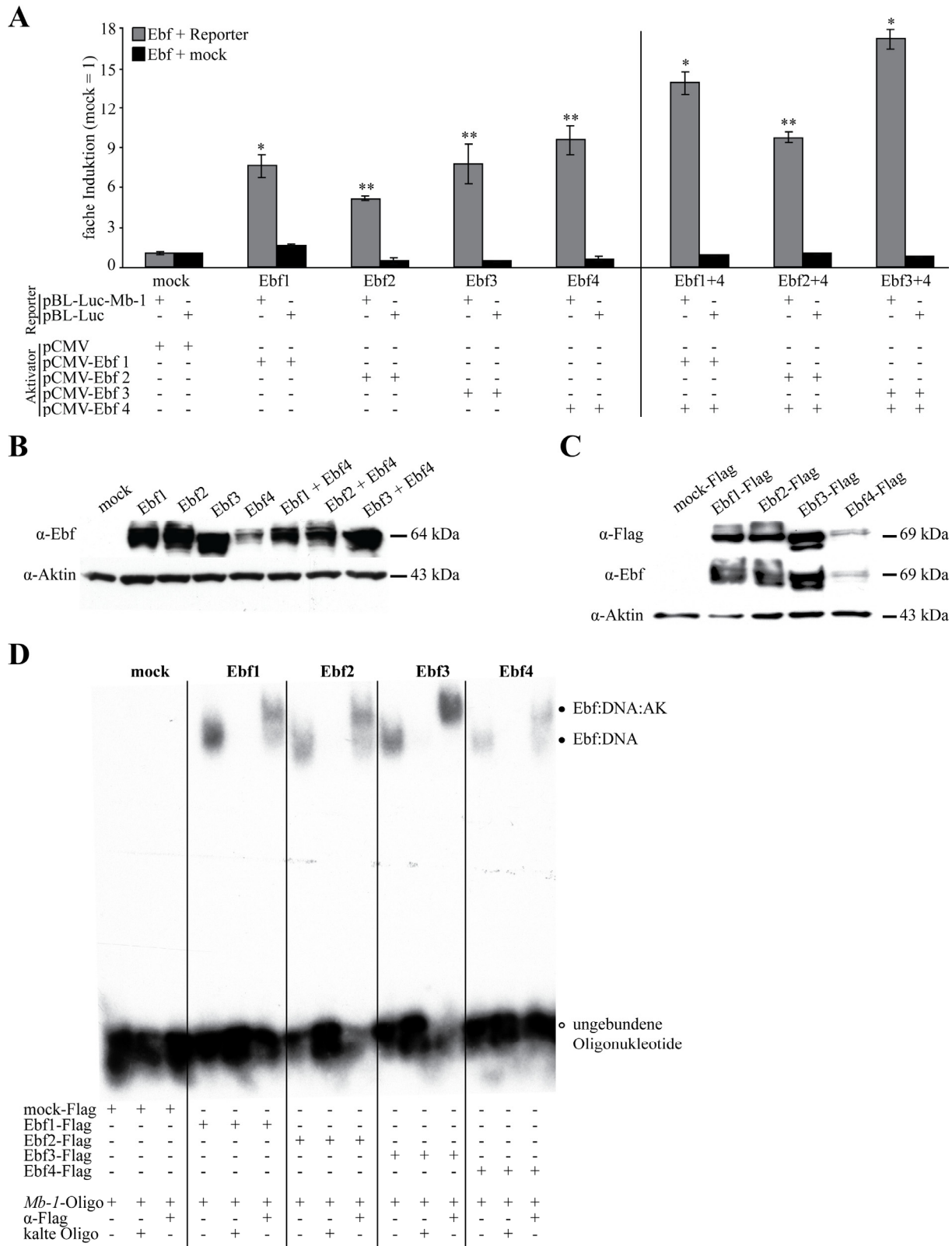
Um eventuelle Einflüsse der Zelllinie auszuschließen, wurde die Reporter-Analyse zudem mit HeLa- und Ba/F3-Zellen wiederholt (Daten nicht gezeigt). Hierbei konnten keine Unterschiede in der Tendenz der Transaktivierung festgestellt werden.

### 3.2.2 Ebf4 kann in der Transaktivierung sowohl eine hemmende als auch eine aktivierende Rolle einnehmen

Wenn demnach Ebf4 als Negativ-Regulator der Transaktivierung der anderen Familienmitglieder fungiert, sollte dieses Phänomen auch mit anderen Promotoren zu beobachten sein. So wurde eine Reihe von B-Zell-spezifischen Promotoren untersucht (siehe 2.1.8.1). Mit allen Promotor-Sequenzen konnte im Gegensatz zu der Repression der Transaktivierung des *AcIII*-Promotors gezeigt werden, dass Ebf4 eine sehr hohe und zu Ebf1, 2 und 3 vergleichbare Transaktivierungs-Kompetenz aufwies (hier gezeigt: *Mb-1*-Promotor, nicht gezeigt für die Promotoren von *B29*, *OcaB*, *FoxO1*,  $\lambda 5$ ; Abb. 3.8A). Da in allen Western Blot-Analysen (Abb. 3.8B) eine geringere Proteinmenge des Ebf4 zu detektieren war, legt dies die Vermutung nahe, dass hier nur ein Teil der tatsächlichen Aktivität festgestellt werden konnte. In Verbindung mit den anderen Proteinen konnte Ebf4 die Transaktivierung der hier untersuchten B-Zell-spezifischen Promotoren signifikant verstärken.

Für Ebf1 konnte bereits gezeigt werden, dass dieses auch im EMSA an die Bindestelle des *Mb-1*-Promotors binden kann (Hagman *et al.*, 1991; Feldhaus *et al.*, 1992). Um die Analyse zu vertiefen, wurde ein EMSA mit Flag-Tag versehenen Ebf-Proteinen (Abb. 3.8C) durchgeführt. So konnte für alle Ebf-Proteine gleichermaßen ein Komplex für die Ebf-DNA-Bindung als auch ein *Supershift* mit Hilfe des Antikörpers (Ebf:DNA:AK) gezeigt werden. Die Bindung konnte mit kalten Oligonukleotiden kompetitiert werden (Abb. 3.8D). Das schwächere Bindungs-Signal des Ebf4-Proteins war vermutlich auf die geringere Proteinmenge zurückzuführen (Abb. 3.8C).



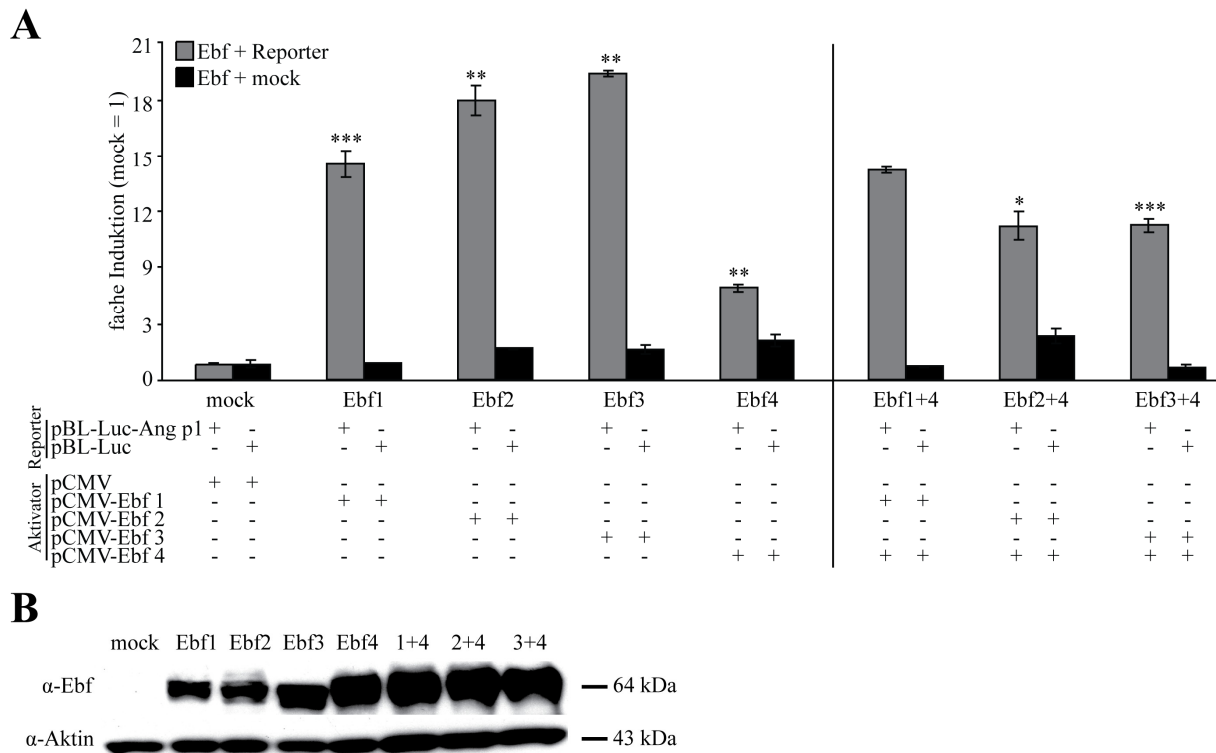


**Abb. 3. 8 Ebf1, 2, 3 und 4 können B-Zell-spezifische Promotoren aktivieren.**

(A) In Luciferase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Tests unter Verwendung eines B-Zell spezifischen Promotors (*Mb-1*) wurde die Transaktivierungsfähigkeit der Ebf-Proteine in HeLa-Zellen getestet. Ebenso wurde die Kombination von Ebf4 mit den anderen Familienmitgliedern analysiert. Das Maß der Transaktivierung wurde auf die Induktion der kotransfizierten  $\beta$ -Galaktosidase normalisiert und relativ zur Kontrolle (*mock*: pCMV+ pBL-Luc-Mb-1+) kalkuliert. Dargestellt wurden die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Standardabweichung (SDM). Signifikanzwerte wurden im Vergleich zur *mock*-Kontrolle des jeweiligen Faktors (pCMV-Ebf+, pBL-Luc+), bzw. in der Kombination von Ebf4 mit den anderen Familienmitgliedern auf die Transaktivierung des jeweiligen Ebf (pCMV-Ebf1/2/3+, pBL-Luc-Mb-1+) ermittelt und mit Sternen gekennzeichnet.  $n=3$ . \* $p<0,01$

**\*\*<0,0001. (B)** Repräsentativer Western Blot zur Kontrolle der Transfektionseffizienz unter Verwendung des anti-Pan-Ebf-Antikörpers und des anti-β-Aktin-Antikörpers zur Ladekontrolle. n=3. **(C)** Proteinmenge der für **(D)** durch transiente Transfektion von HEK293T-Zellen gewonnenen, mit Flag-Tag versehenen, Ebf-Proteine im Western Blot. Die Größe der Proteine wurde durch den Flag-Tag um 5 kDa erhöht. n=3. **(D)** EMSA zur Analyse der Bindungsfähigkeit der Ebf-Faktoren an die Bindestelle des *Mb-1*-Promotors. Ebf:DNA:AK, *Supershift* durch Zugabe des Flag-Antikörpers; Ebf:DNA, Bindung von Protein und Oligonukleotiden; Oligo, Oligonukleotide. n=3.

Zur Erweiterung der Reporter-Studien wurden zudem die Promotoren zweier in Osteoblasten exprimierten Gene untersucht. Mit Hilfe des *Angiogenin* Promotor1 (Abb. 3.9A) und des *Opg*-Promotors (Daten nicht gezeigt) konnte gezeigt werden, dass Ebf1, 2 und 3 eine hohe Transaktivierungs-Fähigkeit, Ebf4 dagegen trotz einer höheren Proteinmenge in jeder der Western Blot-Analysen eine geringe Kompetenz besaß (Abb. 3.9B)



**Abb. 3. 9 Alle Ebf-Proteine sind in der Lage, den *Ang*-Promotor zu transaktivieren.**

**(A)** In Luziferase- und β-Galaktosidase-Tests unter Verwendung des Promotors *Ang p1* wurde die Transaktivierungsfähigkeit der Ebf-Proteine in HEK293T-Zellen überprüft. Ebenso wurde die Kombination von Ebf4 mit den anderen Familienmitgliedern analysiert. Die Induktion der Transaktivierung wurde auf die Induktion der kotransfizierten β-Galaktosidase normalisiert und relativ zur Kontrolle (*mock*: pCMV+ pBL-Luc-Ang-p1+) kalkuliert. Dargestellt wurden die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Standardabweichung (SDM). Signifikanzwerte wurden im Vergleich zur *mock*-Kontrolle des jeweiligen Faktors (pCMV-Ebf+, pBL-Luc+), bzw. in der Kombination mit Ebf4 auf die Transaktivierung des jeweiligen Ebf-Faktors (pCMV-Ebf1/2/3+, pBL-Luc-Ang-p1+) ermittelt und mit Sternen gekennzeichnet. n=3. \*p<0,05 \*\*<0,01 \*\*\*<0,0001. **(B)** Exemplarischer Western Blot zur Kontrolle der Transfektion mit Hilfe des anti-Pan-Ebf-Antikörpers und als Ladekontrolle des anti-β-Aktin-Antikörpers. n=3.

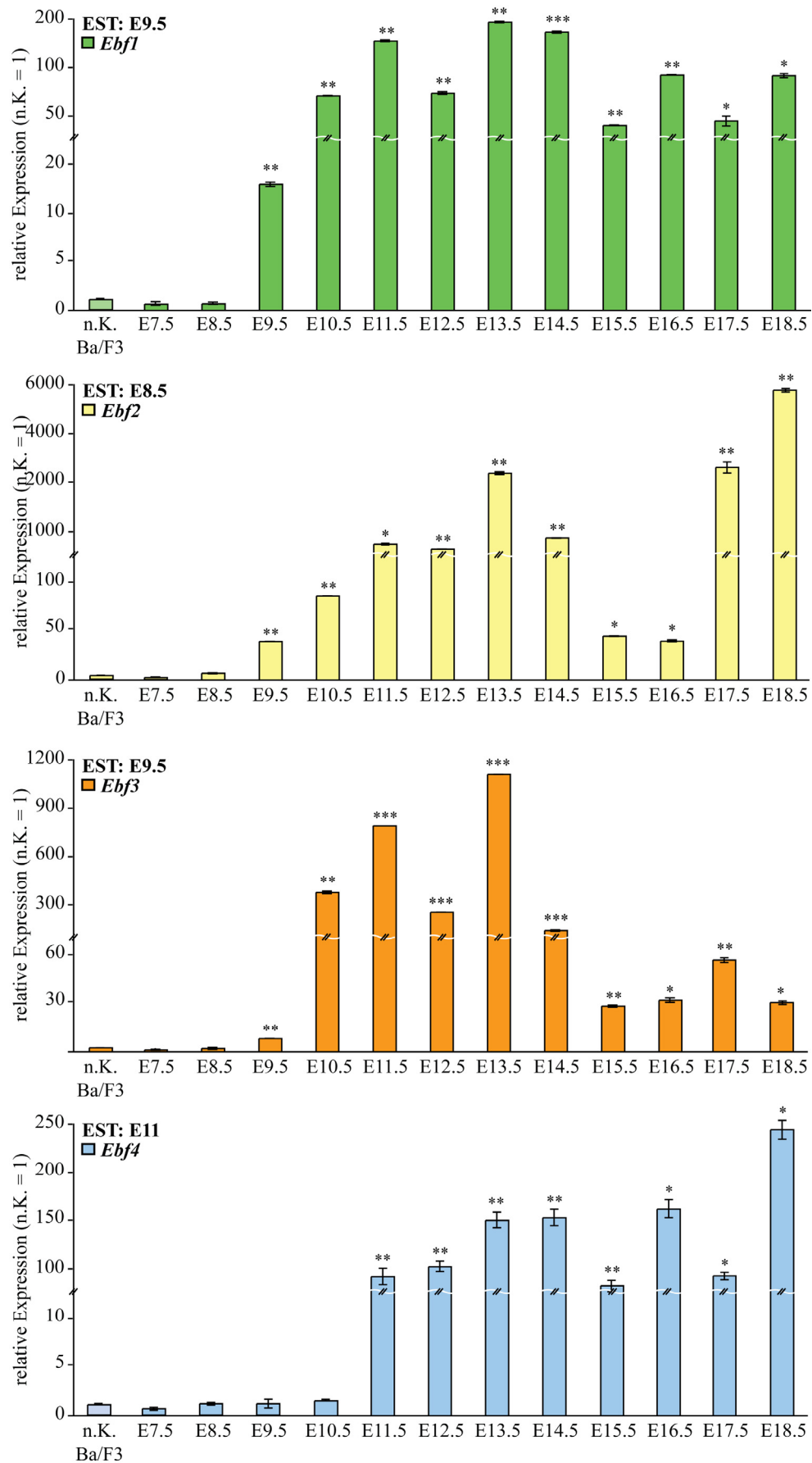
In der Kombination konnte Ebf4 die Aktivität von Ebf2 und Ebf3 reduzieren. Demnach scheint die Fähigkeit von Ebf4, die Transaktivierung der anderen Ebf-Proteine zu beeinträchtigen oder zu verstärken, Promotor- bzw. Gewebe-abhängig zu sein.

### 3.3 Die biologische Rolle von Ebf3 und Ebf4

#### 3.3.1 *Ebf3* und *Ebf4* werden in frühen Stadien der Embryonalentwicklung exprimiert

Um neben der biochemischen Analyse auch die biologische Rolle von Ebf3 und Ebf4 zu klären, wurde eine Reihe von Expressions-Studien durchgeführt. Hierzu wurde das Expressionsmuster der Ebf-Familie während der embryonalen Entwicklung (Abb. 3.10) und in adulten Organen (Abb. 3.11) untersucht. Weiterhin wurde die Expression in sortierten Knochenzellen aus Wildtyp, *Ebf2*<sup>+/-</sup> und *Ebf3*<sup>+/-</sup>-Embryonen (E18.5 pc; Abb. 3.12, 3.14), während der Differenzierung primärer, aus Calvariae isolierter Osteoblasten (Abb. 3.13) und in Zelllinien (siehe 2.1.12) analysiert. Alle Expressionen wurden auf die Expression des Referenzgens Hprt normalisiert und die Effizienzfaktoren der Ebf-Primerpaare eingerechnet. Alle in dieser Analyse verwendeten Primer erkannten sowohl die murine als auch die humane cDNA-Variante der Proben. Als Negativ-Kontrolle diente hierbei, wenn nicht anders angegeben, die Zelllinie Ba/F3, da diese kein *Ebf2*, *3* und *4*, und nur äußerst geringe Mengen an *Ebf1* exprimiert. Gesamt-Zell-Extrakte von *Ebf1*-Deletionstieren konnten nicht als Negativkontrolle der *Ebf1*-Expression verwendet werden, da mit dem verwendeten Primerpaar ein Transkript von *Ebf1* detektiert werden konnte, welches in dem Tiermodell zu keinem aktiven Protein führt. (Im Vergleich zur n.K. Ba/F3 ca. fünffache Expression; Daten nicht gezeigt).

Für das Erlangen eines Gesamteindrucks über die biologische Rolle von Ebf4 war der erste Schritt, die Expression der Ebf-Faktoren während der Embryonalentwicklung zu untersuchen. So konnte bereits für *Ebf1*, *Ebf2* und *Ebf3* eine Expression ab dem embryonalen Stadium E9.5 ermittelt werden (Abb. 3.10, grün, gelb, orange; Garel *et al.*, 1997; Kieslinger *et al.*, 2005). Die Expression von *Ebf4* war im Gegensatz zu den anderen Faktoren erst ab E11.5 pc zu detektieren (Abb. 3.10, blau). Mit allen Ebf-Familienmitgliedern wurde ab dem jeweiligen Zeitpunkt eine starke, variierende Expression bis hin zu E18.5 pc beobachtet. Diese Ergebnisse waren konsistent mit den in Datenbanken verzeichneten frühesten Expressionen (EST; [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)).



**Abb. 3. 10** *Ebf1*, *Ebf2* und *Ebf3* werden ab E8.5 bzw. E9.5 exprimiert, *Ebf4* ab E11.5 pc.

Mittels qRT-PCR wurde die Expression der Ebf-Faktoren in den embryonalen Stadien zwischen E 7.5 pc bis E 18.5 pc anhand von Gesamt-Embryo-Extrakten ermittelt. Notiert wurde zu jedem Gen die in Datenbanken

verzeichnete früheste Expression (EST, *expressed sequence tag*; [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)). Alle ermittelten Expressionen wurden mit dem Effizienzfaktor des jeweiligen Primerpaares multipliziert, auf die Expression des Referenzgens *Hprt* normalisiert und relativ zur Negativkontrolle (n.K. Ba/F3) gezeigt. Dargestellt wurden die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Standardabweichung (SDM). Signifikanzwerte wurden im Vergleich zur Kontrolle kalkuliert und mit Sternen gekennzeichnet. n=3. \*p<0,05 \*\*<0,005 \*\*\*<0,0005.

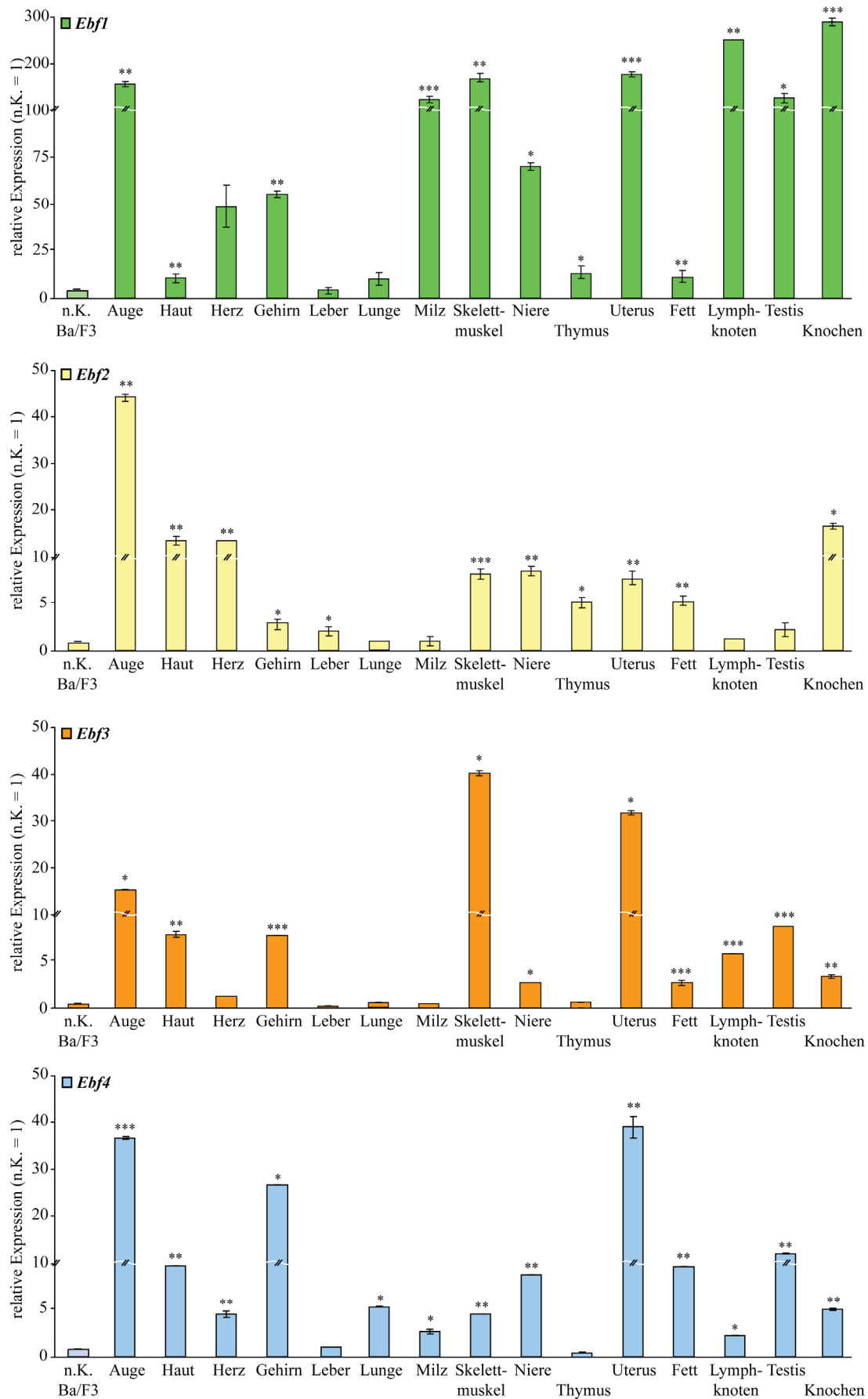
### 3.3.2 Alle Ebf-Faktoren besitzen ein komplexes Expressionsmuster

Um einen weiteren Eindruck über die eventuellen Funktionen von Ebf3 und Ebf4 zu erlangen, wurden im nächsten Schritt die Expressionsmuster der Faktoren in ausgewählten murinen adulten Organen und Geweben analysiert. Die Auswahl der Organe richtete sich unter anderem nach bereits veröffentlichten Expressionsmustern der Faktoren (Tab. 1.1; Malgaretti *et al.*, 1997; Garel *et al.*, 1997; Kieslinger *et al.*, 2005).

*Ebf2* und *Ebf4* waren die einzigen in Thymus und Herz signifikant exprimierten Faktoren (Abb. 3.11, gelb und blau).

Während keine Expression der Familienmitglieder in der Leber entdeckt werden konnte, zeigten sich alle Faktoren in Auge, Gehirn, Haut, Niere und Gesamt-Knochen exprimiert. Eine hohe Expression von *Ebf3* wurde zudem in Skelettmuskeln, Uterus und Testis detektiert (Abb. 3.11, orange).

*Ebf4* zeigte die höchste Expression in Auge und Gehirn und, bis auf Leber und Thymus, konnte in allen untersuchten Organen eine moderate Expression von *Ebf4* gezeigt werden (Abb. 3.11, blau).



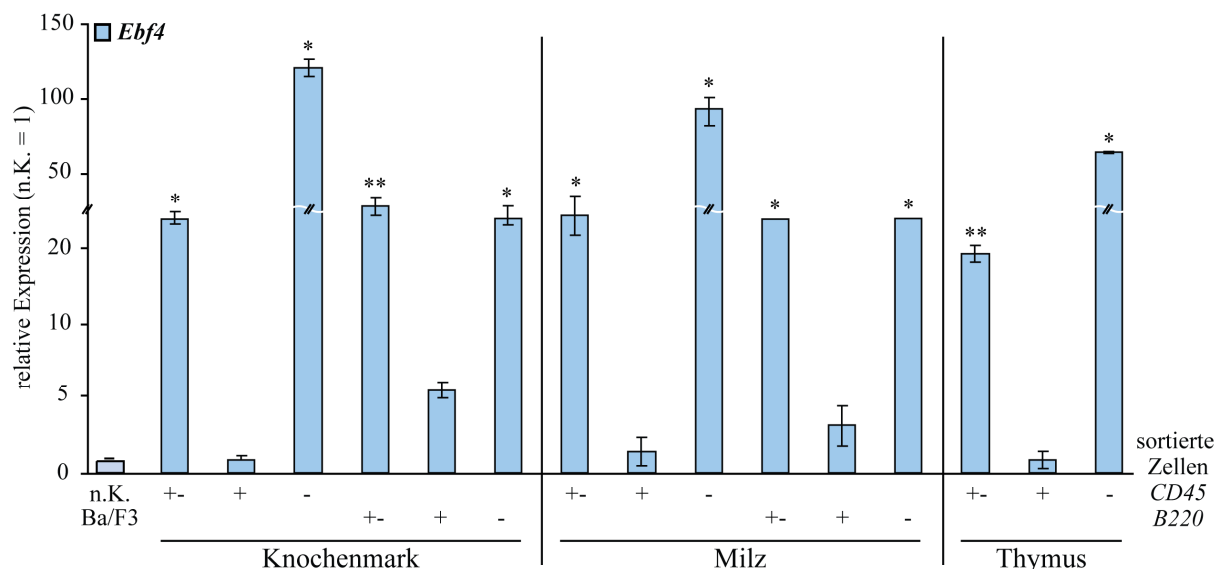
**Abb. 3. 11 Die Ebf-Faktoren zeigen ein komplexes, individuelles Expressionsmuster.**

Analyse der Expression der Ebf-Faktoren in adulten murinen Organen und Geweben mit Hilfe von qRT-PCR. Alle ermittelten Expressionen wurden vorab mit dem Effizienzfaktor des jeweiligen Primerpaares multipliziert,

zur Expression des Referenzgens *Hprt* normalisiert und relativ zur Negativkontrolle (n.K. Ba/F3) gezeigt. Dargestellt wurden die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Standardabweichung (SDM). Signifikanzwerte wurden im Vergleich zur Kontrolle ermittelt und mit Sternen gekennzeichnet. n=3. \*p<0,05 \*\*<0,005 \*\*\*<0,0005.

### 3.3.3 *Ebf3* und *Ebf4* sind nicht in hämatopoetischen Zellen exprimiert

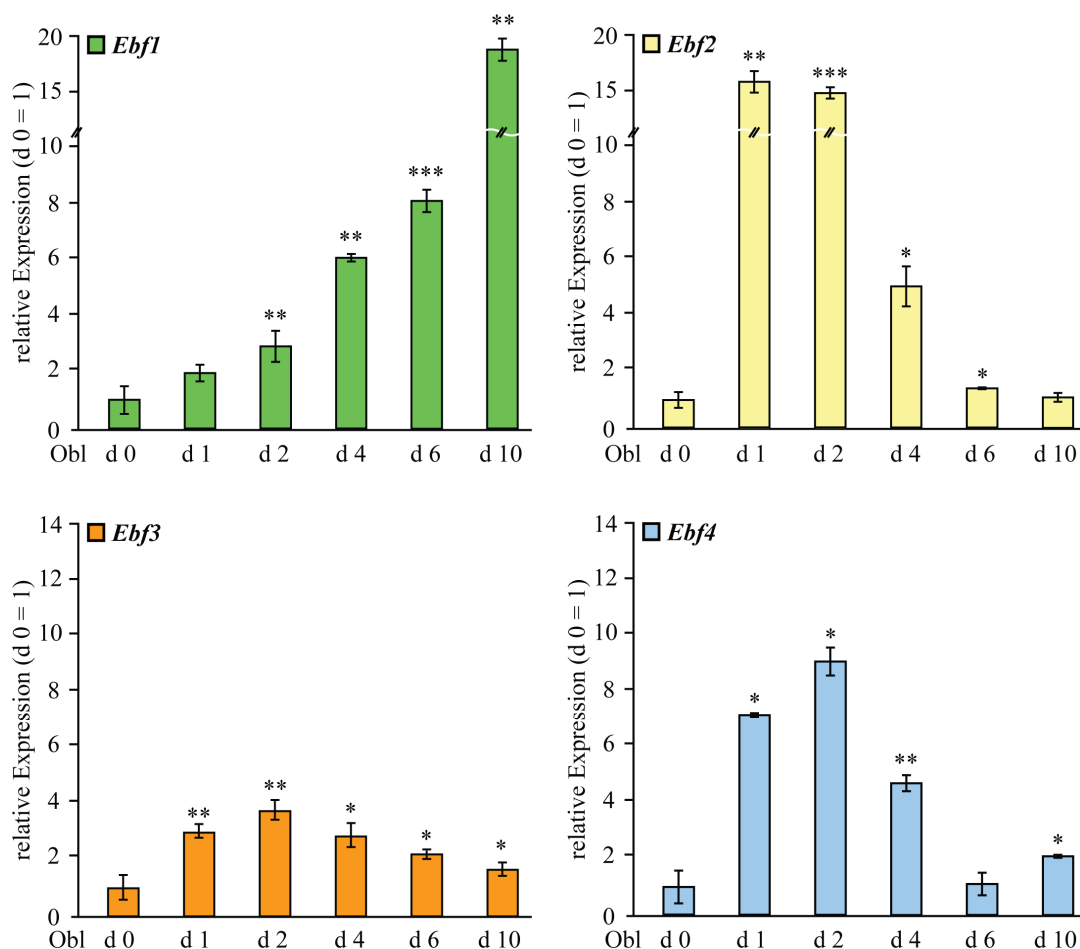
Aufgrund der Koexpression der Ebf-Faktoren im Knochen sollte überprüft werden, ob *Ebf4* ähnlich zu *Ebf1* auch in B-Zellen (Lin und Grosschedl, 1995) oder ähnlich zu *Ebf2* und *Ebf3* in den stromalen Zellen des Knochens (Kieslinger *et al.*, 2005; Jimenez *et al.*, 2007; Abb. 3.1) exprimiert ist. Hierzu diente eine Sortierung der Zellen nach ihrer Expression von CD45 oder B220 mittels Durchflusszytometrie. CD45 ist ein transmembranes Glykoprotein hämatopoetischer Zellen (Thomas und Lefrancois, 1988; Thomas *et al.*, 1989; Trowbridge *et al.*, 1991), während B220 ein Oberflächenprotein von B-Zellen ist (Coffman and Weissman, 1981; Osmond, 1990; Hardy *et al.*, 1991; Osmond *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993). Zum Vergleich wurde die RNA der gesamten Gewebe parallel dazu analysiert (+/-). So konnte die Expression von *Ebf4* fast ausschließlich in den *CD45*<sup>-</sup>-bzw. *B220*<sup>-</sup>-Zellen von Knochenmark, Milz und Thymus detektiert werden, was den Schluß zulässt, dass Ebf4 ähnlich zu Ebf2 und Ebf3 nicht in hämatopoetischen Zellen des Knochens, der Milz und des Thymus exprimiert sein könnte (Abb. 3. 12).



**Abb. 3. 12 *Ebf4* ist in den nicht-hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks exprimiert.**

Mittels qRT-PCR wurde die Expression der Ebf-Faktoren in den Gesamtorganen (+/-) und sortierten Zellen des Knochenmarks, Thymus und der Milz analysiert (*B220*<sup>+</sup> und *B220*<sup>-</sup> sowie *CD45*<sup>+</sup> und *CD45*<sup>-</sup>). Gezeigt ist die relative Expression der analysierten Gene im Vergleich zu einer Negativkontrolle (n.K. Ba/F3). Alle ermittelten Expressionen wurden vorab mit dem Effizienzfaktor des jeweiligen Primerpaares multipliziert und die Expression auf das Referenzgen *Hprt* normalisiert. Dargestellt wurden die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Standardabweichung (SDM). Signifikanzwerte wurden im Vergleich zur Kontrolle kalkuliert und mit Sternen gekennzeichnet. n=3. \*p<0,04 \*\*<0,006.

Mit ihrem Expressionsmuster schienen *Ebf3* und *Ebf4* der Expression von *Ebf2* näher als dem Muster von *Ebf1* zu sein. Bestätigt wurden diese Parallelen mit Hilfe der Analyse der Expression der Familienmitglieder während der Differenzierung von primären Osteoblasten (durchgeführt nach Kieslinger *et al.*, 2005). Hierzu wurden die Osteoblasten aus den Calvariae zweier Wildtyp-Embryonen (E18.5 pc) isoliert und in Osteoblasten-Medium kultiviert. Nach drei Tagen (d 0) wurde die *in vitro* Differenzierung mit Hilfe von  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbinsäure für 10 Tage durchgeführt. An den in der Analyse angegebenen Tagen wurden die RNA der Zellen isoliert und nach der cDNA-Synthese die quantitative Real-Time PCR mit Primern für die Ebf-Faktoren durchgeführt. Während die Expression von *Ebf1* stetig zunahm, war die höchste Expression von *Ebf3* und *Ebf4* ähnlich zu *Ebf2* am zweiten Tag erreicht. Somit waren *Ebf3* und *Ebf4* vorrangig in unreifen Osteoblasten zu detektieren (Abb. 3. 13).



**Abb. 3. 13 *Ebf3* und *Ebf4* sind vorrangig in unreifen Osteoblasten exprimiert.**

Expression der Ebf-Faktoren während der *in vitro*-Differenzierung von primären Osteoblasten (Obl) isoliert aus Calvariae von zwei Wildtyp-Embryonen E18.5 pc. Zum Zwecke der Normalisierung diente die Expression des Referenzgens *Hprt*. Die ermittelte relative Expression wurde mit dem jeweiligen Effizienzfaktor multipliziert und im Vergleich zu der Expression am Tag der Präparation (d 0) gezeigt. Dargestellt wurden die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Standardabweichung (SDM). Signifikanzwerte wurden im Vergleich zur Kontrolle ermittelt und mit Sternen gekennzeichnet. d, Tag. n=3. \*p<0,05 \*\*<0,005 \*\*\*<0,0001.



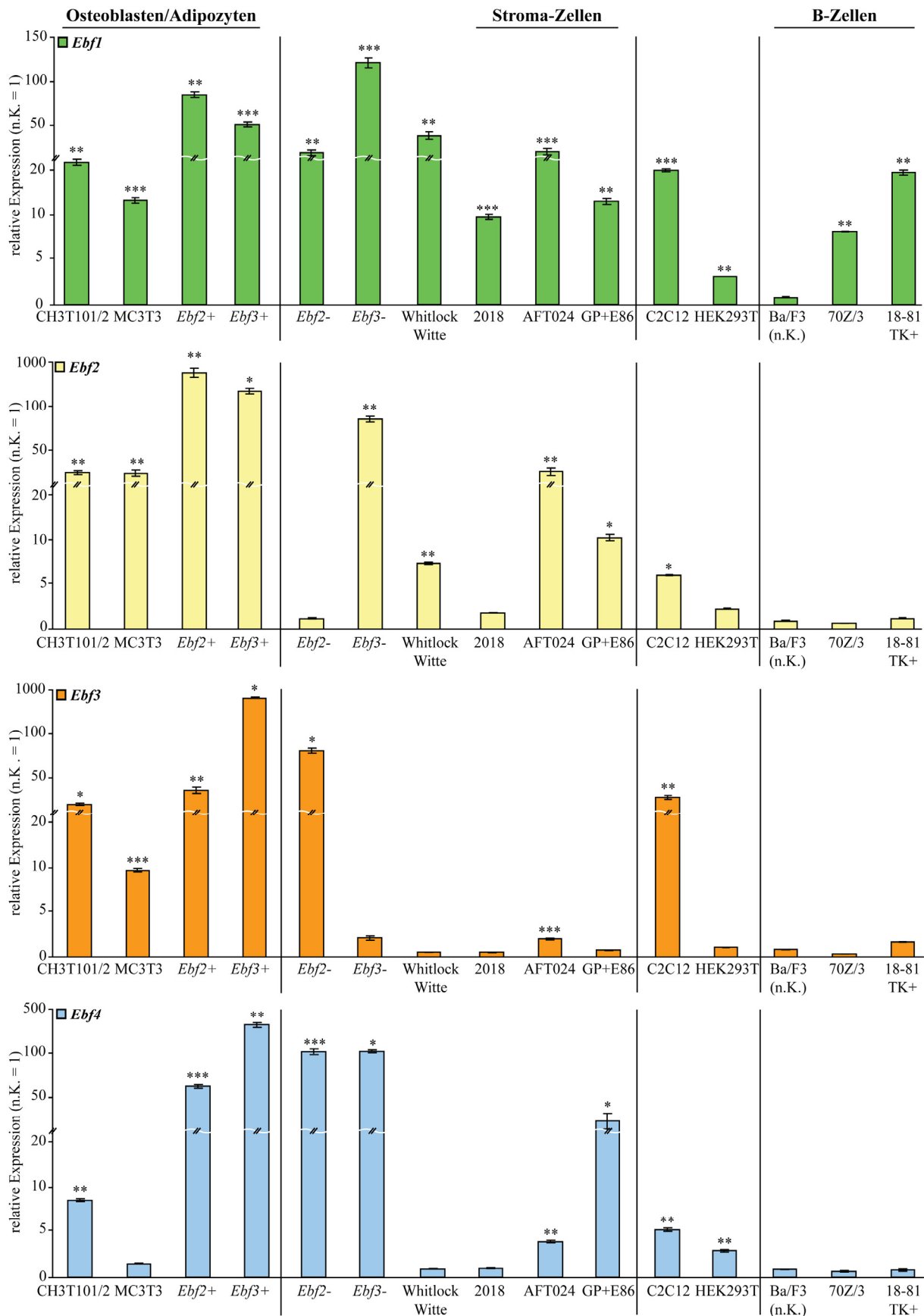
Als Erweiterung der Analysen sollte die Expression der Ebf-Faktoren in verschiedenen Zelllinien analysiert werden. Hierzu wurden nicht nur verschiedene B-Zell-, Osteoblasten- und andere Zelllinien, sondern auch primäre, sortierte Knochenzellen (*Ebf2-Gfp<sup>±</sup>*, sowie *Ebf3-lacZ<sup>±</sup>*) und von Inga Ludenberg (HMGU München) isolierte und kultivierte Whitlock-Witte-Zellen, welche eine Mixtur aus stromalen und hämatopoetischen Zellen darstellen, untersucht.

*Ebf1* war, wie bereits *in vivo* mit primären B-Zellen gezeigt (Lin und Grosschedl, 1995), vor allem in den B-Zell-Linien, aber auch in osteoblastären und adipozytären Zellen exprimiert (Ackerblad *et al.*, 2002; Hesslein *et al.*, 2009; Abb. 3.14, grün). Weiterhin konnte eine Expression in der prämyoblastischen Zelllinie C2C12 beobachtet werden.

*Ebf2* war, wie bereits publiziert, in Osteoblasten und Adipozyten zu detektieren (Ackerblad *et al.*, 2002; Kieslinger *et al.*, 2005; Jimenez *et al.*, 2007; Abb. 3.14, gelb). Zudem war der Faktor in AFT024 exprimiert, welche eine stammzellunterstützende Stroma-Zelllinie ist (Moore *et al.*, 1997).

*Ebf3* schien vor allem in osteoblastären und adipozytären Zelllinien exprimiert zu sein (Ackerblad *et al.*, 2002; Jimenez *et al.*, 2007; Abb. 3.14, orange). Ebenso konnte eine hohe Expression in den prämyoblastischen C2C12-Zellen detektiert werden.

*Ebf4* war konsistent mit den in Abb. 3.12 gezeigten Daten in nicht-hämatopoetischen Zelllinien, wie CH3T101/2, AFT024 und GP+E86, aber auch in C2C12 exprimiert (Abb. 3.14, blau).



**Abb. 3. 14 *Ebf3* und *Ebf4* sind vorrangig in osteoblastären und adipozytären Zellen exprimiert.**

Mittels qRT-PCR wurde die Expression der Ebf-Faktoren in Zelllinien untersucht. Weiterhin wurden sortierte Knochenzellen von heterozygoten Tieren (*Ebf2-Gfp*<sup>±</sup>, sowie *Ebf3-lacZ*<sup>±</sup>) und primäre, von Inga Ludenberg (HMGU München) isolierte und kultivierte Whitlock-Witte-Zellen analysiert. Alle ermittelten Expressionen wurden vorab mit dem Effizienzfaktor des jeweiligen Primerpaares multipliziert, die Expression auf das

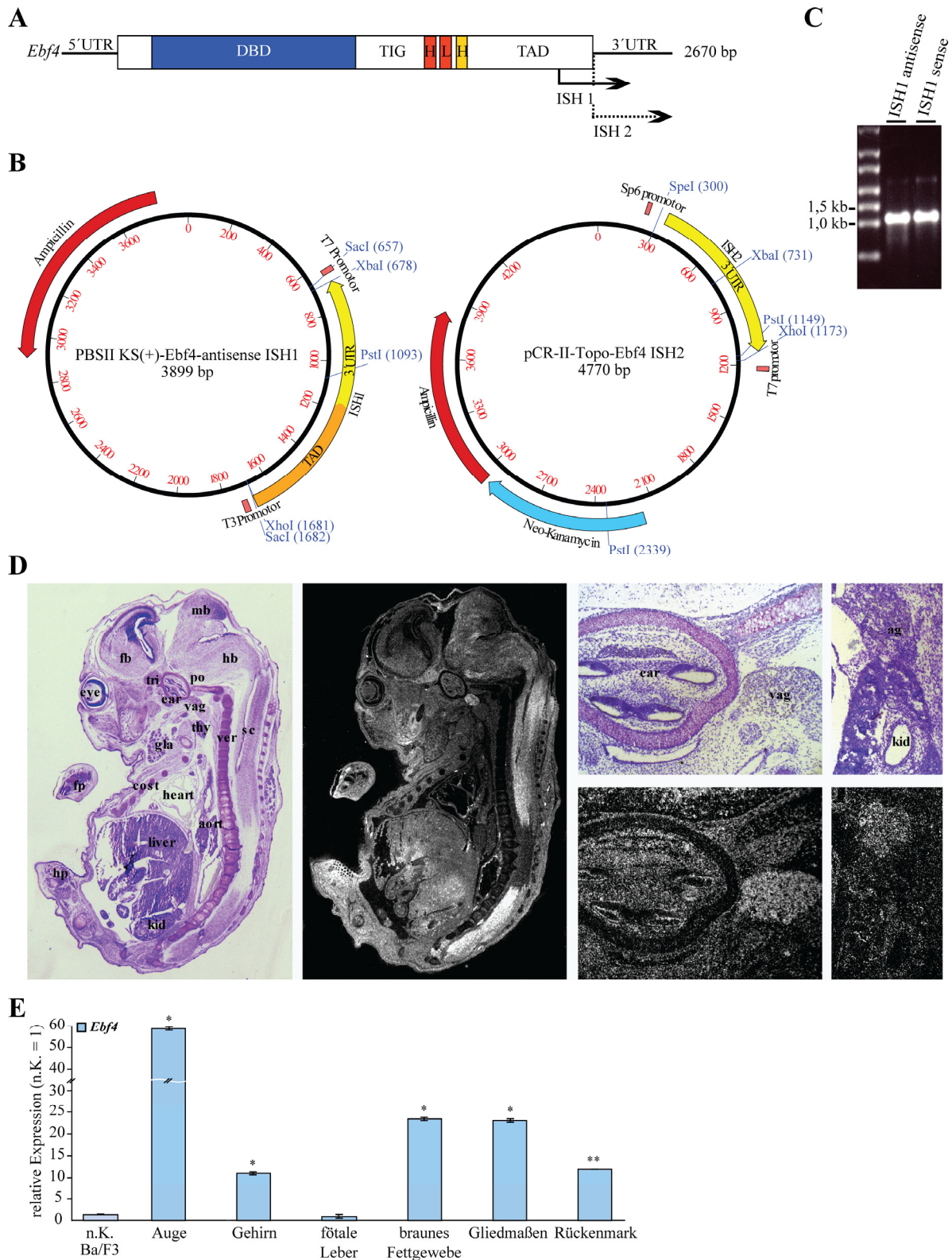
Referenzgen *Hprt* normalisiert und relativ zur Kontrolle (n.K. Ba/F3) kalkuliert. Dargestellt wurden die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Standardabweichung (SDM). Signifikanzwerte wurden im Vergleich zur Kontrolle ermittelt und mit Sternen gekennzeichnet. n=3. \*p<0,05 \*\*<0,005 \*\*\*<0,0005.

### 3.4 Entwicklung eines konditionalen Deletions-Models für *Ebf4*

#### 3.4.1 *Ebf4* ist in neuronalen Geweben exprimiert

Um einen weiteren Eindruck der Funktion von *Ebf4* während der Embryonalentwicklung zu gewinnen, sollte die Expression von *Ebf4* in der Wildtyp-Situation detaillierter geklärt werden. Hierzu wurden zwei verschiedene *in situ*-Hybridisierungs-(ISH)-Sonden etabliert. ISH 1 bindet zum Teil an das 3'-Ende des translatierten Bereichs der prädominanten Isoform von *Ebf4* und zum anderen Teil an die 3'UTR (untranslatierte Region) des Gens. Die zweite Sonde ist ausschließlich komplementär zur 3'UTR des *Ebf4* und sollte damit alle Spleißvarianten erkennen. Die Verwendung zweier *antisense*-Sonden sollte zusätzlich zu den „sense“-Kontrollen eine weitere Kontrolle der spezifischen Bindung der Sonden ermöglichen (Abb. 3.15A). Die Vektoren wurden, wie unter 2.2.2.4.1 beschrieben, linearisiert (Abb. 3.15B) und mit Hilfe des *T7*-Promotors bzw. des *Sp6*-Promoters transkribiert. Die korrekte Transkription des *T7*-Promotors wurde auf einem RNA-Gel überprüft (Beispiel der ISH1-sense und -antisense Sonden, Abb. 3.15C). Die *in situ* Hybridisierung wurde in Kooperation mit Miriam Homburg (Arbeitsgruppe Dr. Daniela Vogt-Weisenhorn, HMGU München) anhand longitudinaler Schnitte von Embryonen verschiedener Stadien (E11.5 bis E15.5 pc) durchgeführt. So war in den Analysen deutlich ein Signal der RNA-*antisense*-Sonden vor allem in neuronalen Geweben wie dem zentralen Nervensystem und den zugehörigen Ganglien zu erkennen (Abb. 3.15D, E15.5 pc, andere embryonale Stadien nicht gezeigt).

Zur Validierung dieser Experimente wurde eine quantitative Real-Time PCR anhand diverser embryonaler Organe in diesem Stadium durchgeführt (Abb. 3.15E). So konnte die Expression von *Ebf4* im zentralen Nervensystem (Gehirn, Rückenmark), aber auch in den Gliedmaßen bestätigt werden. Da in der fötalen Leber anhand der qRT-PCR keine Expression von *Ebf4* detektiert wurde, könnten die in der *in situ* Hybridisierung erkennbaren Signale unspezifisch aufgrund von Rissen und Gewebeüberlagerungen des Schnittes sein. Dies und die Expression von *Ebf4* im Auge und im braunen Fettgewebe sollten jedoch künftig in weitergehenden Analysen mit anderen Schnitten mittels *in situ* Hybridisierung untersucht werden, um auch hier eine eindeutige Antwort zu erhalten.



**Abb. 3. 15 *Ebf4* ist vor allem in neuronalen Geweben exprimiert.**

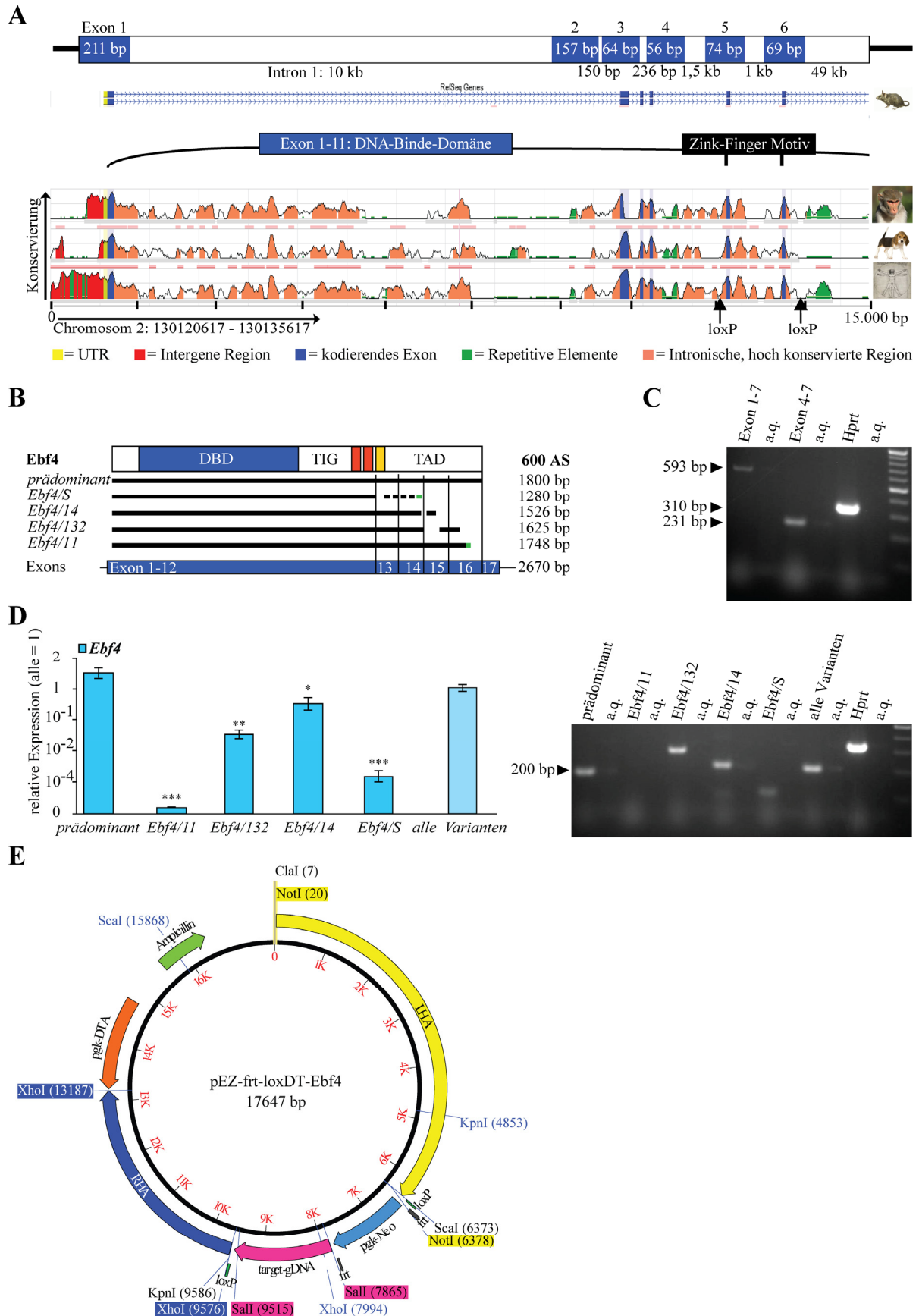
Zur *in situ* Analyse der *Ebf4*-Expression wurden zwei verschiedene, sich überlappende Sonden generiert. (A) Schema des *Ebf4*-Gens und skizzierte Bindung und Länge der Sonden (ISH 1 und ISH 2). Sonde ISH 1 ist zum Teil komplementär zu dem translatierten C-terminalen Bereich des Gens und der 3'UTR; ISH 2 bindet ausschließlich im untranslatierten Bereich (3'UTR). (B) Plasmidkarten der Sonden ISH1-*antisense* und ISH2 (*sense* und *antisense*). (C) Repräsentatives RNA-Gel zur Überprüfung der RNA der Sonde ISH 1. (D) Die *in situ* Hybridisierung in Kooperation mit M. Homburg (HMGU München) eines E 15.5 pc Embryos (longitudinaler Schnitt) zeigt die Expression von *Ebf4* mit Hilfe der ISH1-*antisense*-Sonde. ag, adrenal gland (Nebennierendrüse); aort, Aorta; cost, costals (Rippen); ear, Ohr; eye, Auge; fb, forebrain (Vorderhirn); fp,

*forepaw* (Vorderbein); *gla*, *submandibular gland* (Speicheldrüse); *hb*, *hindbrain* (Hinterhirn); *heart*, Herz; *hp*, *hindpaw* (Hinterbein); *kid*, *kidney* (Niere); *liver*, fötale Leber; *mb*, *midbrain* (Mittelhirn); *po*, *pons* (Brücke); *sc*, *spinal cord* (Rückenmark); *thy*, Thymus; *tri*, *trigeminal ganglion* (Drillingsnerv); *vag*, *vagal ganglion* (Vagusnerv); *ver*, *vertebrae* (Rückenwirbel). (E) Quantitative Real-Time-PCR-Analyse von fötalen Organen (E 15.5 pc) zur Analyse der Expression von *Ebf4*. Die Expression wurde auf die Expression des Referenzgens *Hprt* normalisiert und relativ zu einer Negativkontrolle (n.K. Ba/F3) kalkuliert. Dargestellt wurden die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Standardabweichung (SDM). Signifikanzwerte wurden im Vergleich zur Kontrolle ermittelt und mit Sternen gekennzeichnet. n=3. \*p<0,007 \*\*<0,001.

### 3.4.2 Das Zink-Finger-Motiv der DNA-Binde-Domäne als potentiell Ziel einer konditionalen Deletion

*Ebf4* besitzt demnach, wie auch die anderen Ebf-Familienmitglieder, ein ausgeprägtes Expressionsmuster. Da die Deletion einzelner Familienmitglieder zu komplexen und teilweise letalen Phänotypen führt (siehe Einleitung), und eine Koexpression in Zellen des Knochens, aber auch in neuronalen Geweben detektiert werden konnte, sollte die Deletion von *Ebf4* über eine konditionale Strategie durchgeführt werden. Damit bestünde die Möglichkeit, eine Deletion gewebspezifisch oder, im Falle von Letalität, zu einem später gewählten Zeitpunkt nach der Geburt durchzuführen, und somit die Analyse der Funktion auch im adulten Tier zu ermöglichen. Das bekannteste System der konditionalen Deletion ist das Cre/loxP-System (Cre, *causes recombination*; *loxP*, *locus of crossover in P1*), bei welchem die kurzen, 34 bp langen *loxP*-Sequenzen durch die Cre-Rekombinase erkannt und rekombiniert werden, wodurch die zwischen ihnen befindliche DNA als zirkuläres Fragment herausgeschnitten und anschließend von der Zelle abgebaut wird (Sauer und Henderson, 1988; Kühn *et al.*, 1995; Review: Rajewsky *et al.*, 1996). Ein anderes System ist die Flp/*frt*-Technologie, welche dem bereits beschriebenen System ähnelt. Hierbei werden 48 bp lange *frt*-Sequenzen (*flp recognition target*) und die Flp-Rekombinase (Flippase) aus *Saccharomyces cerevisiae* genutzt (Review: Chen und Rice, 2003).

Da das *Ebf4*-Gen mit 17 Exons und über 74,5 kb insgesamt zu groß für eine komplette konditionale Deletion ist, sollte die Deletion eines funktionellen Teils des Proteins erfolgen. Wie schon in der Einleitung erwähnt, bietet sich das Zink-Finger-Motiv der Ebf-Proteine als optimales Ziel an, da es essentiell für die DNA-Bindung ist. Das Zink-Finger-Motiv von *Ebf4* wird von den Exons 5 und 6 kodiert (skizziert in Abb. 3.16A; [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).



**Abb. 3. 16 Die Strategiefindung zur konditionalen Deletion von *Ebf4*.**

(A) Die DNA-Binde-Domäne des *Ebf4* wird durch die Exons 1 bis 11 und das darin befindliche Zink-Finger-Motiv in den Exons 5 und 6 kodiert. Der Abgleich der genomischen Sequenzen zwischen Maus, Affe, Hund und Mensch zeigt den Grad der Konservierung der Exons (blau), repetitiven Elemente (grün) und intronischen

Regionen (rosa, weiß). Datenbank von [www.ecrbrowser.dcode.org](http://www.ecrbrowser.dcode.org). **(B)** Schema des Ebf4-Proteins sowie der DNA der prädominanten und vier weiterer Spleißvarianten des *Ebf4* nach Wang *et al.* (2002). **(C)** Mittels PCR (35 Zyklen) wurde das alternative Spleißen zwischen Exons 1-7 und 4-7 in adultem Gehirn untersucht. **(D)** In qRT-PCR-Analysen wurde die Expression der verschiedenen Spleißvarianten in Gesamt-RNA-Extrakt aus adultem Gehirn analysiert. Die relative Expression wurde zur Expression des Referenzgens *Hprt* normalisiert und relativ zu einer Kontrolle (alle Varianten) ermittelt. Dargestellt wurden die Mittelwerte der biologischen Replikate und die Standardabweichung (SDM). Signifikanzwerte wurden im Vergleich zur Kontrolle ermittelt und mit Sternen gekennzeichnet. n=3. \*p<0,02 \*\*<0,002 \*\*\*<0,0001. **(E)** Skizzierung des *Targeting*-Vektors. LHA, linker Homologiearm; RHA, rechter Homologiearm; target-gDNA, Ziel-DNA.

Nach der Analyse der Konservierung in verschiedenen Spezies wurden für die Positionierung der *loxP*-Sequenzen intronische, nur wenig konservierte Regionen in den Introns 4 und 6 gewählt, um eventuelle negative Einflüsse durch Zerstörung konservierter Regionen oder regulatorischer Elemente zu vermeiden (Pfeile; Abb. 3.16A; [www.ecrbrowser.dcode.org](http://www.ecrbrowser.dcode.org)). Ein Vorteil an dieser Strategie war zudem, dass bei einer Cre-Rekombination eine Rasterverschiebung der Triplet-Basenabfolge von Exon 4 zu Exon 7 stattfinden würde und es damit zu einem Stop der Transkription im 7. Exon durch ein neu entstandenes artifizielles Stop-Codon käme. Die so entstandene mRNA würde dadurch für ein trunkiertes Protein mit ca. 150 Aminosäuren kodieren, wodurch es möglicherweise zu einem Nonsense-vermittelten Abbau der mRNA und damit einer erfolgreichen kompletten Deletion von *Ebf4* kommen könnte.

Gemäß Wang *et al.* (2002) kodiert *Ebf4* für 5 verschiedene Spleißvarianten (skizziert in Abb. 3.16B). Zur Überprüfung des alternativen Spleißens wurde eine PCR über 35 Zyklen mit cDNA aus adultem Gehirn (Abb. 3.16C) und Gesamt-Embryo (E17.5 pc; Daten nicht gezeigt) durchgeführt. Wie schon in dieser Veröffentlichung gezeigt, konnte weder ein alternatives Spleißen zwischen den Exons 1 und 7, noch in der Zielregion zwischen den Exons 4 und 7 detektiert werden. *Hprt* diente hierbei als Kontrolle der cDNA. Weiterhin wurde die Expression der Varianten in einer quantitativen Real-Time PCR über 40 Zyklen überprüft. So konnte analog zu Wang *et al.* (2002) in adultem Gehirn und Gesamt-Embryo (E17.5 pc; Daten nicht gezeigt) eine hohe Expression der prädominanten Variante, jedoch nur eine signifikant schwächere Expression der anderen Spleißvarianten detektiert werden (Abb. 3.16D).

Da demnach auch kein alternatives Spleißen gegen die Deletionsstrategie sprach, wurde die Strategie, die *loxP*-Sequenzen in die intronischen Regionen 4 und 6 zu setzen weiter verfolgt. (Abb. 3.16 E).

So wurde mit Hilfe einer BAC-Klon-basierten PCR-Klonierung die Region zwischen Exon 2 und Intron 4 als linker Homologiearm (LHA) gewählt. (Abb. 3.17A). Exon 5 und 6 inklusive der intronischen Regionen wurde als Ziel-Sequenz (*target-gDNA*) zwischen die beiden *loxP*-

Sequenzen kloniert und ca. 3,6 kb des 6. Introns als rechter Homologiearm (RHA) genutzt. Nach der homologen Rekombination mit dem endogenen *Ebf4*-Locus sollte das Ziel-Allel nachfolgend an die endogene Struktur des LHA eine *loxP*-Sequenz aufzeigen. Daran anschließend sollte die von 2 *frt*-Sequenzen flankierte *Neomycin*-Resistenzkassette integriert sein. Nachfolgend an eine der endogenen DNA entsprechenden Zielsequenz sollte eine weitere *loxP*-Sequenz und anschließend wiederum die endogene Struktur des *Ebf4* folgen (RHA).

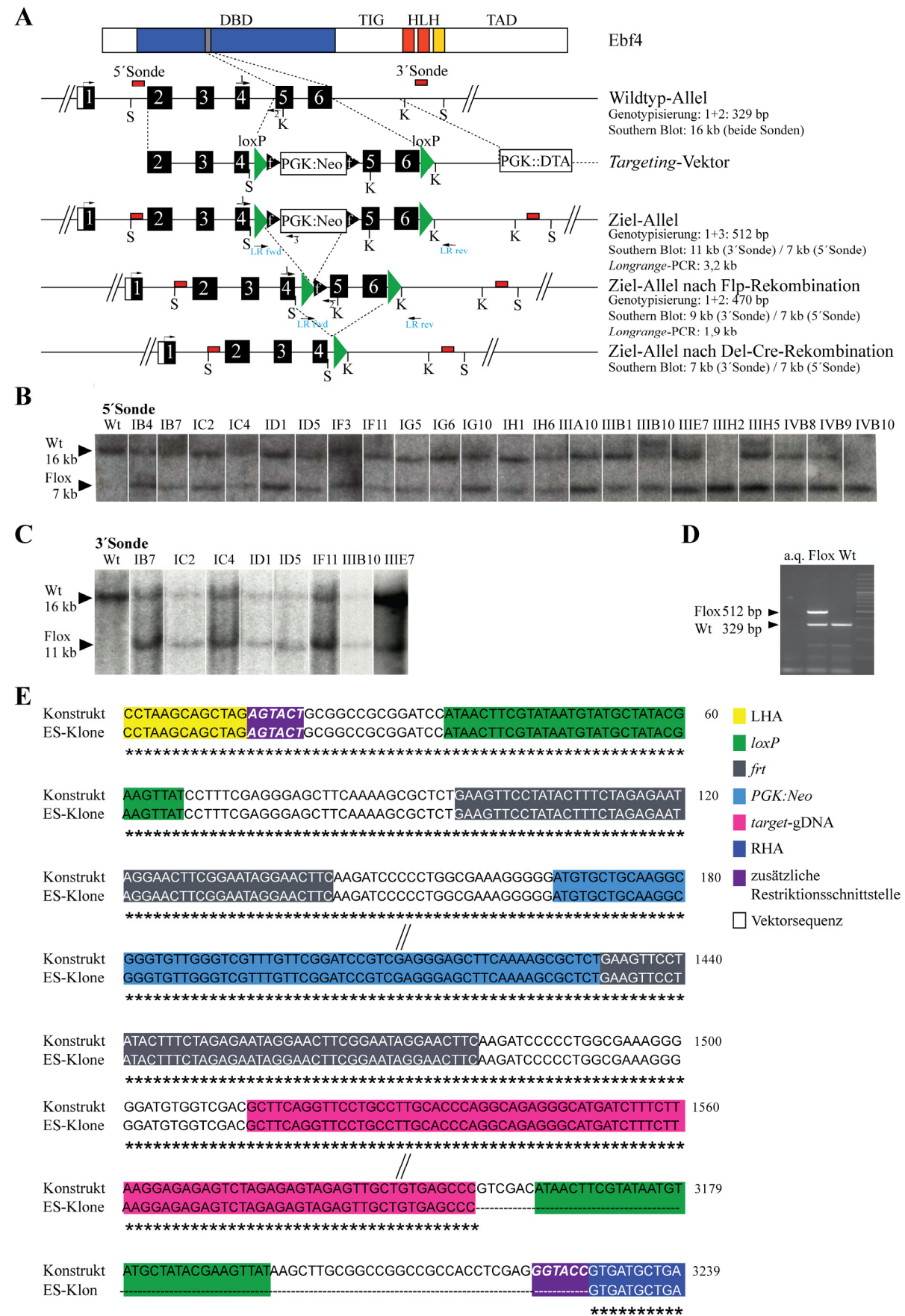
### 3.4.3 ES-Zell-Analyse

Zur Überprüfung der Strategie wurde eine 5'-Sonde etabliert, welche im endogenen Locus ausserhalb der verwendeten Sequenzen des LHA bindet (Abb. 3.17A, rotes Rechteck). Als Möglichkeit der Detektion wurde hierzu eine zusätzliche *ScaI*-Restriktionsschnittstelle direkt neben die 5'*loxP*-Sequenz kloniert. Mit Hilfe dieser Restriktionsschnittstelle und der DNA-Sonde konnten 22 der 281 untersuchten ES-Zell-Klone positiv hinsichtlich der Integration der 5'*loxP*-Sequenz detektiert werden (Abb. 3.17B). Dies entspricht einer Rekombinationsrate von 8 %.

Um die korrekte Integration der 3'*loxP*-Sequenz zu untersuchen, konnte keine funktionelle Sonde etabliert werden, bei welcher die zusätzliche *KpnI*-Restriktionsschnittstelle genutzt werden konnte. Demnach bestand die einzige Möglichkeit darin, eine weitere Sonde ebenfalls mit der zusätzlichen *ScaI*-Restriktionsschnittstelle neben der 5'*loxP*-Sequenz zu verwenden. Mit dieser Sonde kann zwar die Insertion der *Neomycin*-Resistenzkassette bestätigt werden, nicht jedoch die der *loxP*-Sequenz, da diese mit 34 bp zu klein ist, um deren Fehlen in der Southern Blot Analyse zu erkennen. Von daher wurde als ergänzende Strategie eine *Longrange*-PCR etabliert, deren Primer an der Sequenz der 5'*loxP* (LR fwd) und dem RHA (LR rev) bindet (Abb. 3.17A). Mit dieser doppelten Analyse sollte die korrekte Insertion der 3'*loxP*-Sequenz in den endogenen Locus abgesichert werden. In den Southern Blot-Analysen wiesen 8 der 22 Klone das Signal für Wildtyp- und Ziel-Allel auf (Abb. 3.17C). Jedoch zeigte keiner dieser 8 potentiell korrekten ES-Zell-Klone nach der *Longrange*-PCR und einer anschließenden Sequenzierung eine genomische Integration der 3'*loxP*-Sequenz auf (Beispiel Sequenzvergleich Abb. 3.17E).

Mit Hilfe der ES-Zellen aus der ersten Southern Blot Analyse (Abb. 3.17B) wurde parallel zur Überprüfung der 3'*loxP*-Sequenz die Genotypisierung der Mäuse per PCR etabliert (Abb. 3.17D).





**Abb. 3. 17 Manipulation und Selektion von ES-Zellen zur konditionalen Deletion von *Ebf4*.**  
(A) Schema der konditionalen Deletion von *Ebf4*. Gezeigt sind die ersten 6 kodierenden Exons, die Lage der endogenen Sonden (rot) des Southern Blots, sowie die Bindung der Primer für die Genotypisierung (Pfeile 1 bis

3) und *Longrange*-PCR (blau, LR). Mit Pfeilköpfen wurden Orientierung und Lage der *loxP*- (grün) sowie *frit*-Sequenzen (schwarz) eingezeichnet. Die Lage der PGK:Neo-Kassette (Neomycin-Resistenzkassette) wurde gekennzeichnet. Mit gestrichelten Linien wurden die jeweils korrespondierenden Teile der genomischen DNA skizziert. Gezeigt wurde die Situationen des Wildtyp-Allels, des *Targeting*-Vektors und des Ziel-Allels vor und nach der Rekombination mit *Flp*-Rekombinase und *Del-Cre*-Rekombinase. K, *KpnI*; S, *ScaI*. Southern Blot-Analyse der ES-Zell-Klone mit Hilfe der **(B)** 5'Sonde und **(C)** der 3'Sonde. Mit Pfeilköpfen wurden die Höhen der Signale für Wildtyp (Wt) und Flox (erfolgreiche Integration der *loxP*-Sequenz) gekennzeichnet. Die angegebenen Namen entsprechen der Plattennummer und -Position. **(D)** Genotypisierung unter Verwendung von Wildtyp- und Flox-ES-Zellen. **(E)** Exemplarische Sequenzierung und Vergleich der ES-Zell-DNA mit der DNA des *Targeting*-Vektors. Parallele Striche stehen für nicht gezeigte, sich entsprechende Sequenzen. Lage der Homologiesequenzen, Restriktionsschnittstellen und vektorbasierten Sequenzen (*loxP*, *frit*, PGK:Neo) wurden farbig unterlegt.

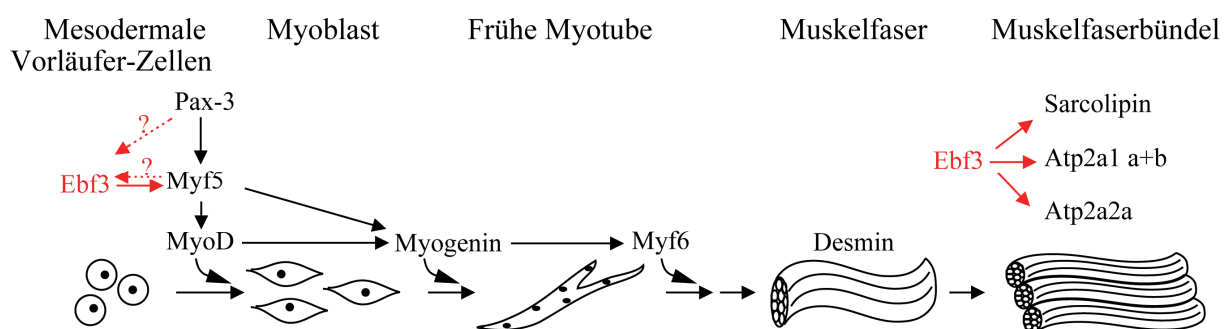
## 4. DISKUSSION

### 4.1 Die Rolle von Ebf3 in der Entwicklung von Muskelzellen des Diaphragmas

In *Drosophila melanogaster* und *Xenopus laevis* konnte bereits eine Beteiligung der Proteine der Ebf-Familie in der Muskelentwicklung gezeigt werden. So wurde für Collier, dem *Drosophila* Ortholog für Ebf, eine Rolle in der Entwicklung und der Myoblasten-Fusion eines spezifischen Muskels des mittleren Körpersegments zugeschrieben (Crozatier und Vincent, 1999). Später wurden diese Ergebnisse um die Erkenntnis erweitert, dass die Expression von Collier sowohl autoregulatorisch als auch in Synergie mit dem MyoD-Ortholog Nautilus getrieben wird (Dubois *et al.*, 2007). In *Xenopus* konnte kürzlich durch *knockdown*-Analysen von *Xcoe2* und *Xcoe3* eine Funktion für die Organisation der Somiten, der Migration der hypaxialen Muskelanlagen und die Entwicklung der Kiefermuskeln ermittelt und damit eine essentielle Rolle in der Entwicklung der Skelettmuskulatur beobachtet werden (Green und Vetter, 2011). Weiterhin konnte in dieser Publikation gezeigt werden, dass *Myf5* ein direktes und *MyoD* ein zum Teil direktes Zielgen von *Xcoe3* ist, und MyoD ähnlich wie das *Drosophila* Ortholog Nautilus, in der Lage ist, die Expression von *Xcoe2* zu beeinflussen. MyoD und Myf5 gehören zu der Familie der MRF, welche durch eine basische HLH (bHLH) ausgezeichnet und essentiell in der Muskelentwicklung sind (siehe 1.2.2; Sassoon, 1993; Buckingham, 2001). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte in dieser Arbeit in *Mus musculus* eine Expression von *Ebf3* in den Zellen der Skelettmuskulatur (Garel *et al.*, 1997) und des Diaphragmas demonstriert werden (Abb. 3.1, Abb. 3.11). Konsistent mit diesem Expressionsmuster konnte eine starke Expression von *Ebf3* in der murinen prämyoblastischen Zelllinie C2C12 gezeigt werden und damit ein weiterer Hinweis auf eine Funktion in Muskelzellen geliefert werden (Abb. 3.14). Weiterhin wurden eine signifikante Reduktion von *Myf5*, *MyoD* und *Myogenin* in *Ebf3*<sup>-/-</sup>-Tieren und ein induzierender Effekt von Ebf3 in der *in vitro*-Differenzierung von C2C12 zu muskulären Zellen detektiert (Abb. 3.4, Abb. 3.5). Nach Analyse der Promotorregionen von *Myf5* und *MyoD* konnten mehrere potentielle Ebf-Bindestellen identifiziert werden. Im *Myf5*-Promotor konnten 922 bp, 3,23 kb und 5,01 kb vor der transkriptionellen Startsequenz (-922 bp, -3,23 kb, -5,01 kb) potentielle Ebf-Bindestellen und bei -5,82 kb eine dem *Mb-1*-Promotor (nach Travis *et al.*, 1991) ähnliche Erkennungssequenz ermittelt werden. Der *MyoD*-Promotor besitzt an den Stellen -126 bp und -131 bp typische der Ebf-Bindestelle entsprechende innere Palindrome (nach Travis *et al.*, 1993; Hagman *et al.*, 1993; 1995). Zusätzlich kommen noch leicht variierte Bindestellen an

den Positionen -22 bp und -3,12 kb in Frage. In weitergehenden Analysen sollten diese Bindestellen in Reporter-Studien und ggf. Gelretardierungs-Experimenten auf ihre Funktionalität als Ebf-Bindestellen überprüft werden.

Durch die Studien in *Xenopus* und *Mus musculus* kann davon ausgegangen werden, dass Ebf3 in der Muskelentwicklung *upstream* von Myf5 und MyoD agiert. Ob jedoch ähnlich zu den orthologen Transkriptionsfaktoren Collier, Xcoe2 und Xcoe3 auch eine Beeinflussung von Ebf3 durch die Muskelfaktoren in Form einer positiven Rückkopplung existiert, muss weitergehend untersucht werden. Eine derartige Beziehung zwischen einem Ebf-Faktor und einem bHLH-Faktor existiert z.B. in *Xenopus* in neuronalem Zusammenhang zwischen Xcoe2 und dem *downstream* gelegenen proneuralen bHLH-Faktor NeuroD (Dubois *et al.*, 1998). In *Mus musculus* konnte ein ähnlicher Mechanismus in der B-Zell-Entwicklung zwischen Ebf1 und dem bHLH-Faktor E2A aufgezeigt werden, wie unter 1.1.3 erläutert (Kee und Murre, 1998; Greenbaum und Zhuang 2002). In diesem Beispiel ist zudem ähnlich zur Muskelentwicklung ein Familienmitglied der Pax-Familie involviert (Nutt *et al.*, 1998; O’Riordan und Grosschedl, 1999; Bajard *et al.*, 2006; Buckingham, 2007). Demnach wäre es denkbar, dass das Zusammenspiel von Faktoren dieser drei Familien einen zentralen Mechanismus in der Differenzierung von Zellen darstellen könnte. Bisher jedoch ungeklärt ist, ob Ebf3, wie in Abb. 4.1 eingezeichnet, tatsächlich hierarchisch nach den für die Muskeldifferenzierung wichtigen Pax-Genen steht. Dieser Hypothese sollte in nachfolgenden Experimenten nachgegangen werden, um das Bild von *Ebf3* in der Muskelentwicklung zu erweitern.



**Abb. 4. 1 Mögliche Rollen von Ebf3 in der Muskelentwicklung des Diaphragmas.**

Schematische Darstellung der Muskelentwicklung siehe auch Abb. 1.4. Mögliche Beziehungen von Ebf3 mit anderen Faktoren wurden mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Gestrichelte Pfeile mit Fragezeichen stellen vermutete, aber bisher nicht demonstrierte Beziehungen zwischen den Faktoren dar.

So könnten sich interessante Parallelen zu der Entwicklung von B-Zellen ergeben. *Myf5* könnte ähnlich dem *E2A* (siehe Abb. 1.2) parallel zu Ebf3 exprimiert sein und eventuell mit Hilfe einer positiven Feedback-Schleife die Expression von *Ebf3* steuern. Obwohl aufgrund

der Deletions-Studien *Myf5 downstream* von *Ebf3* exprimiert zu sein scheint, ist bekannt, dass *Myf5* in der Lage ist, die eigene Expression zu regulieren (Thayer *et al.*, 1989; Abb. 4.1).

Um jedoch einen direkten Einfluss von *Ebf3* auf die Zielgene *Myf5* und eventuell auch *MyoD* zu bestätigen, welches laut Taibakhsh *et al.* (1997) *downstream* von *Myf5*, laut Haldar *et al.* (2008) auch unabhängig von *Myf5*, in der Entwicklung der Skelettmuskulatur des Rumpfes agiert, sollte dies *in vitro* mit Hilfe von Cycloheximid ähnlich der Publikation von Green und Vetter, 2011 künftig untersucht werden. Hierzu könnten C2C12-Zellen mit einem *Ebf3*-Expressionsplasmid transient transfiziert werden und nach einer vorab ermittelten Zeit Cycloheximid zugegeben werden. Dadurch würde untersucht werden, ob bei Hemmung der allgemeinen Proteinsynthese *Ebf3* in der Lage ist, die Expression der potentiellen Zielgene zu steuern. Weiterhin ist geplant, die Repression von *Myf5* und *MyoD* in *Ebf3*<sup>-/-</sup>-Tieren auch auf Protein-Ebene mit Hilfe von Western Blot-Antikörpern zu verifizieren. Die Studien sollten zudem von dem Diaphragma auf die Skelettmuskulatur der Gliedmaßen erweitert werden. So könnte auch eine immunhistologische Analyse Aufschluss über eine Koexpression von *Ebf3-lacZ* mit den Muskelgenen geben. Zudem sollten die *in vitro*-Differenzierungsexperimente mit sortierten mesenchymalen Stammzellen durchgeführt werden. Hier könnte ein eventueller *Rescue*-Effekt von *Ebf3* in *Ebf3*<sup>-/-</sup>-Zellen zu einer besseren Differenzierung von Muskelzellen führen.

Eine weitere Frage ist, inwieweit *Ebf3* einen essentiellen Regulator der Muskeldifferenzierung, respektive des Diaphragmas darstellt. So konnte gezeigt werden, dass in den Diaphragmen von Wildtyp-Embryonen *Ebf1* stärker als *Ebf3* exprimiert ist, und dass auch in der prämyoblastischen Zelllinie C2C12 eine ähnliche Expression zu beobachten ist (Abb. 3.1, Abb. 3.14). Zudem führte die ektopische Expression von *Ebf1* ebenso zu einer Induktion der Muskelzelldifferenzierung, wie es mit *Ebf3* zu beobachten war (Abb. 3.5). Weiterhin konnte in Reporterstudien veranschaulicht werden, dass beide *Ebf*-Faktoren gleichermaßen in der Lage waren, den Promotor des für die Funktion des Diaphragmas wichtigen *Atp2a1* zu transaktivieren (Abb. 3.6). Dennoch führt die Deletion des *Ebf3* zu einem fortschreitend zyanotischen Phänotyp mit Schnappatmung und früher Letalität, während die Deletion von *Ebf1* zu keinem dieser Merkmale führt. Von daher stellt sich die Frage, warum trotz der höheren Expression von *Ebf1* im Diaphragma kein derartiger Phänotyp bei der Deletion von *Ebf1* beobachtet werden kann. Eine mögliche Erklärung des Phänotyps liefern die Beobachtungen in der Publikation von Jiminez *et al.* (2007). Hier wurde gezeigt, dass in der Differenzierung von Adipozyten *Ebf3* durch *Ebf2* kompensiert wurde, während *Ebf1* und *Ebf2* keine redundante Wirkungsweise zeigten. Demnach wäre es möglich,

dass die Deletion von *Ebf1* im Diaphragma durch die Expression von *Ebf3* kompensiert werden könnte, diese Redundanz jedoch nicht gegenseitiger Natur ist. Denkbar wäre z.B., dass potentiell unterschiedliche Interaktionspartner die Funktion von *Ebf1* und *Ebf3* differentiell steuern.

Eine weitere Erklärung wäre, dass die Proteine möglicherweise von verschiedenen Zelltypen exprimiert werden. *Ebf3* könnte vorrangig in den muskulären Zellen und *Ebf1* in den nicht-muskulären Zellen des Diaphragmas exprimiert sein. So konnte im Falle der B-Zell-Entwicklung in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *Ebf1* als einziges Familienmitglied in B-Zelllinien exprimiert ist, aber dennoch alle Ebf-Faktoren in der Lage sind, B-Zell-spezifische Promotoren zu transaktivieren. Aufschluss über diese Möglichkeit ergäbe eine Sortierung der *Ebf3-lacZ*-positiven und -negativen Fraktionen in Kombination mit Muskelmarkern, um nicht nur eine Aussage über die Verteilung der Expression von *Ebf3* in den verschiedenen Zellen des Diaphragmas zu erhalten, sondern auch gleichzeitig die muskulären Zellen des Diaphragmas zu isolieren und eine anschließende Analyse der MRF und Ebf-Faktoren auf mRNA-Ebene zu ermöglichen.

## **4.2 Ist Ebf3 der bisher unbekannte Grund der Brody-Erkrankung?**

Die Brody-Erkrankung ist durch die schmerzfreie Verkrampfung der quergestreiften Muskulatur, vor allem von Armen und Beinen, Muskelsteifigkeit und eine verminderte Muskelrelaxation aufgrund eines beeinträchtigten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports charakterisiert (Brody 1969; Karpati *et al.*, 1986; Benders *et al.*, 1994). In 50 % der Fälle ist die Mutation von *Atp2a1* die Ursache der Brody-Erkrankung (Zhang *et al.*, 1995; Odermatt *et al.*, 1996; 1997; 2000; Karpati und MacLennan, 1999). So wurde zur Aufklärung der Brody-Erkrankung ein murines *Atp2a1*-Deletions-Mausmodell generiert, bei welchem jedoch abweichend zum Menschen eine fortschreitende Zyanose, Schnappatmung und Letalität kurz nach der Geburt beobachtet wurde (Pan *et al.* 2003).

Ähnlich zu diesem Phänotyp wurde nach der Deletion von *Ebf3* ebenfalls ein fortschreitender zyanotischer Phänotyp mit Schnappatmung beobachtet, welcher innerhalb weniger Minuten zu Letalität führte (siehe 1.1.5 und 1.2.5; bisher unpubliziertes Mausmodell von M. Garcia-Dominguez und P. Charnay, Institut der Biologie, Ecole Normale Supérieure, Paris). Dieser, im Vergleich zu dem in Wang *et al.* (2004) beschriebenen, drastischere Phänotyp könnte ähnlich dem Phänomen des sich immer weiter verstärkenden Phänotyps der Deletion von *Ebf1* sein. Die Deletion des *Ebf1* führte in einem reinen C57BL/6J-Hintergrund zu

embryonaler Letalität (Lin und Grosschedl, 1995; Zandi *et al.*, 2008; Tsapogas *et al.*, 2011). Demnach könnte die Verstärkung des Phänotyps von *Ebf3* ebenso auf die ausschließliche Verpaarung mit C57BL/6J-Tieren zurückzuführen sein. Bezüglich der Ursache des Phänotyps wurde bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe mittels von-Kossa-Färbungen gezeigt, dass der Knochenaufbau selbst normal ist (Daten nicht publiziert, Dr. S. Jin, HMGU München) und in den Durchflusszytometrie-Analysen eine zum Wildtyp vergleichbare Verteilung an *CD45*<sup>+</sup> und *CD45*<sup>-</sup>-Zellen zu beobachten war (Abb. 3.1). Von daher kann davon ausgegangen werden, dass keine Dysorganisation der Rippenknochen dem Phänotyp zugrunde liegt. Auch eine mögliche beeinträchtigte Funktion der Lunge scheidet aufgrund der fehlenden Expression von *Ebf3* (Abb. 3.1, Abb. 3.11) und den Strukturanalysen mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Daten nicht publiziert, Dr. G. Burgstaller und Dr. T. Klein-Rodewald, beide HMGU München) als Ursache aus. Aus diesen Gründen und der detektierten Expression von *Ebf3* im Diaphragma scheint der Phänotyp in einer dysorganisierten Funktion des Diaphragmas begründet zu sein. Erste elektronenmikroskopische Analysen zeigten eine übermäßige Kontraktion des Diaphragmas ähnlich dem zu beobachtenden Phänotyp nach der Deletion von *Atp2a1* (siehe 1.2.4, Pan *et al.*, 2003; 1.2.5, Daten nicht publiziert, Dr. P. Kopp und Dr. T. Klein-Rodewald, beide HMGU München), was auf eine Störung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports bedingt durch (1) eine Deregulation des *Atp2a1* oder (2) eine Dysfunktion der Sercal-Pumpe hindeutet. So konnte bezüglich Theorie (1) *in vivo* als auch *in vitro* durch Deletions- und Überexpressionsstudien gezeigt werden, dass die Expression von *Atp2a1* durch die Expression von *Ebf3* beeinflusst wird (Abb. 3.2, Abb. 3.5). Im Gegensatz zu den von Pan *et al.* (2003) untersuchten *Atp2a1*-Deletions-Tieren führte die Deletion *Ebf3* nicht nur zu einer Reduktion von *Atp2a1a* und *b*, sondern auch zu einer verminderten Expression von *Atp2a2a* und *b*, was auf eine hierarchisch höher gestellte Position von *Ebf3* hindeuten könnte.

Zudem konnte die Funktionalität der Ebf-Bindestellen im *Atp2a1*-Promotor und damit einhergehend die Transaktivierung aller Ebf-Faktoren demonstriert werden (Abb. 3.3, Abb. 3.6). In weitergehenden Studien mit Hilfe von Cycloheximid (siehe 4.1) und Chromatin-Immunpräzipitation, welche *in vitro* zum direkten Nachweis einer Protein-DNA-Bindung dient, soll untersucht werden, ob *Atp2a1* ein direktes Zielgen ist, wie es in Abb. 4.1 dargestellt wurde. Weiterhin ist geplant, eine vermutliche Koexpression von *Atp2a1* mit *Ebf3* im Diaphragma mit Hilfe von Durchflusszytometrie- und immunhistochemischen Analysen zu untersuchen. Aber nicht nur eine Ebf3-vermittelte Expression von *Atp2a1* könnte die Ursache der Hyperkontraktion sein, sondern auch (2) ein indirekter Effekt über die Regulation von

*Sarcolipin* (Odermatt *et al.*, 1998; Asahi *et al.*, 2003a; b) wäre vorstellbar. So wurde *in vivo* die Expression von *Sarcolipin* schon im heterozygoten Zustand durch die auf mRNA-Ebene detektierbare Reduktion von *Ebf3* verringert (Abb. 3.2). Die Ebf3-Proteinmenge der heterozygoten Tiere konnte nicht in Western Blot-Analysen überprüft werden, da der verwendete anti-Pan-Ebf-Antikörper alle Ebf-Proteine gleichermaßen erkennt.

Dementsprechend wäre es denkbar, dass die Abwesenheit von Ebf3 zu einer unzureichenden Expression von *Atp2a1* und folglich mangelhaften Funktion der Sercal-Pumpe führt, wodurch es zu einem verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport aus dem Zytosol in das Lumen des Sarko(endo)plasmatischen Retikulums und damit einer Hyperkontraktion kommt. Zur Klärung des womöglich veränderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports werden derzeit in Kooperation mit Dr. Matias Mosqueira und Prof. Dr. Rainer Fink (Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg) die Diaphragmen von *Ebf3*<sup>+/+</sup>, *Ebf3*<sup>+/-</sup> und *Ebf3*<sup>-/-</sup>-Embryonen bezüglich ihrer  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme analysiert (nach Teichmann *et al.*, 2008). Zudem wird die Muskelkraft bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und nach elektrischer Stimulation gemessen (nach Friedrich *et al.*, 2004). Weiterhin wird die Muskelstruktur über *Second Harmonic Generation* (Frequenzverdopplung) untersucht, welche dazu dient, die Kollagenfasern und das Myosin der quergestreiften Muskulatur mit Hilfe eines Multiphotonenmikroskops sichtbar zu machen (nach Friedrich *et al.*, 2008). Diese Analysen könnten die Hyperkontraktilität mit verzögerter Relaxation der Muskelzellen des Diaphragmas in den Deletionstieren erklären.

Um zu untersuchen, ob die Brody-Erkrankung auch im Menschen auf eine Mutation des *Ebf3* zurück geführt werden kann, ist es geplant, in Kooperation mit Prof. Dr. Alex Odermatt (Institut der Pharmazeutischen Wissenschaften, Universität Basel) Patientenproben mit diagnostizierter Brody-Erkrankung, welche nicht auf eine Mutation von *Atp2a1* zurück zu führen waren, auf eine eventuelle *Ebf3*-Mutation hin zu untersuchen. So wurde in diesen Patientenproben eine Reduktion der Proteinmenge oder der Aktivität von Sercal nachgewiesen, deren Ursache jedoch in einigen Fällen ungeklärt blieb (Benders *et al.*, 1994; Odermatt *et al.*, 1997; 1998; 2000). Da in den Diaphragmen von *Ebf3*<sup>-/-</sup>-Tieren ebenfalls eine Reduktion von Sercal zu beobachten war, könnte demnach Ebf3 den bisher unbekannten zweiten Schlüsselfaktor der Brody-Erkrankung darstellen.

### **4.3 Ebf4 – ein atypisches Familienmitglied der Ebf-Familie?**

Ebf4, der bisher letzte in *Mus musculus* entdeckte Transkriptionsfaktor der Ebf-Familie könnte aufgrund seiner nur schwachen transaktivierenden Funktion ein atypischer Faktor der



Familie sein (Wang *et al.*, 2002). Um diese Hypothese näher zu charakterisieren, wurde eine Reihe von biochemischen und biologischen Untersuchungen in dieser Arbeit durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass Ebf4 keine Transaktivierung des mit zehn Ebf-Bindestellen konkatenierten *AcIII*-Promotors durchführen kann, wie auch in Wang *et al.* (2002) publiziert (Abb. 3.7). Weiterhin wurde demonstriert, dass Ebf4 in der Lage ist, die Transaktivierungs-Kompetenz der anderen Familienmitglieder bezüglich dieses *AcIII*-Promotors zu reprimieren. Diese Fähigkeit scheint jedoch Promotor- bzw. Gewebe-abhängig zu sein, da Ebf4 bezüglich B-Zell-spezifischer Promotoren (*Mb-1*, *B29*, *OcaB*, *FoxO1*,  $\lambda 5$ ) durchaus in der Lage war, diese zu transaktivieren. Ebenso wurde mit Hilfe von Gelretardierungs-Experimenten demonstriert, dass Ebf4 ebenso wie die anderen Ebf-Proteine in der Lage ist, spezifisch an Oligonukleotide für die Ebf-Bindungsstelle des *Mb-1*-Promotors zu binden. Zudem konnte Ebf4 die Transaktivierung der anderen Ebf-Faktoren bzgl. B-Zell-spezifischer Promotoren signifikant verstärken (Abb. 3.8). In osteoblastärem Zusammenhang wiederum war Ebf4 nur in geringem Maße dazu fähig, die Transaktivierung des Promotors zu bewerkstelligen und reduzierte die Transaktivierungs-Fähigkeit der anderen Familienmitglieder (Abb. 3.9). Die Fähigkeit, die Transaktivierungs-Kompetenz der anderen Familienmitglieder zu beeinflussen, ist dennoch keine spezifische Funktion von Ebf4. So zeigten zusätzliche Reporter-Analysen, dass z.B. Ebf3 in der Lage ist, die Transaktivierung von Ebf1 und Ebf2 jeweils bezüglich des  $\lambda 5$ -Promotors signifikant zu verstärken (Daten nicht gezeigt). Eine reprimierende Funktion von Ebf2 bezüglich Ebf1 konnte sowohl mit Hilfe des  $\lambda 5$ - als auch des verwendeten modifizierten *AcIII*-Promotors detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Demnach ist es denkbar, dass es eine generelle Fähigkeit aller Ebf-Faktoren ist, sich gegenseitig kontextabhängig beeinflussen zu können.

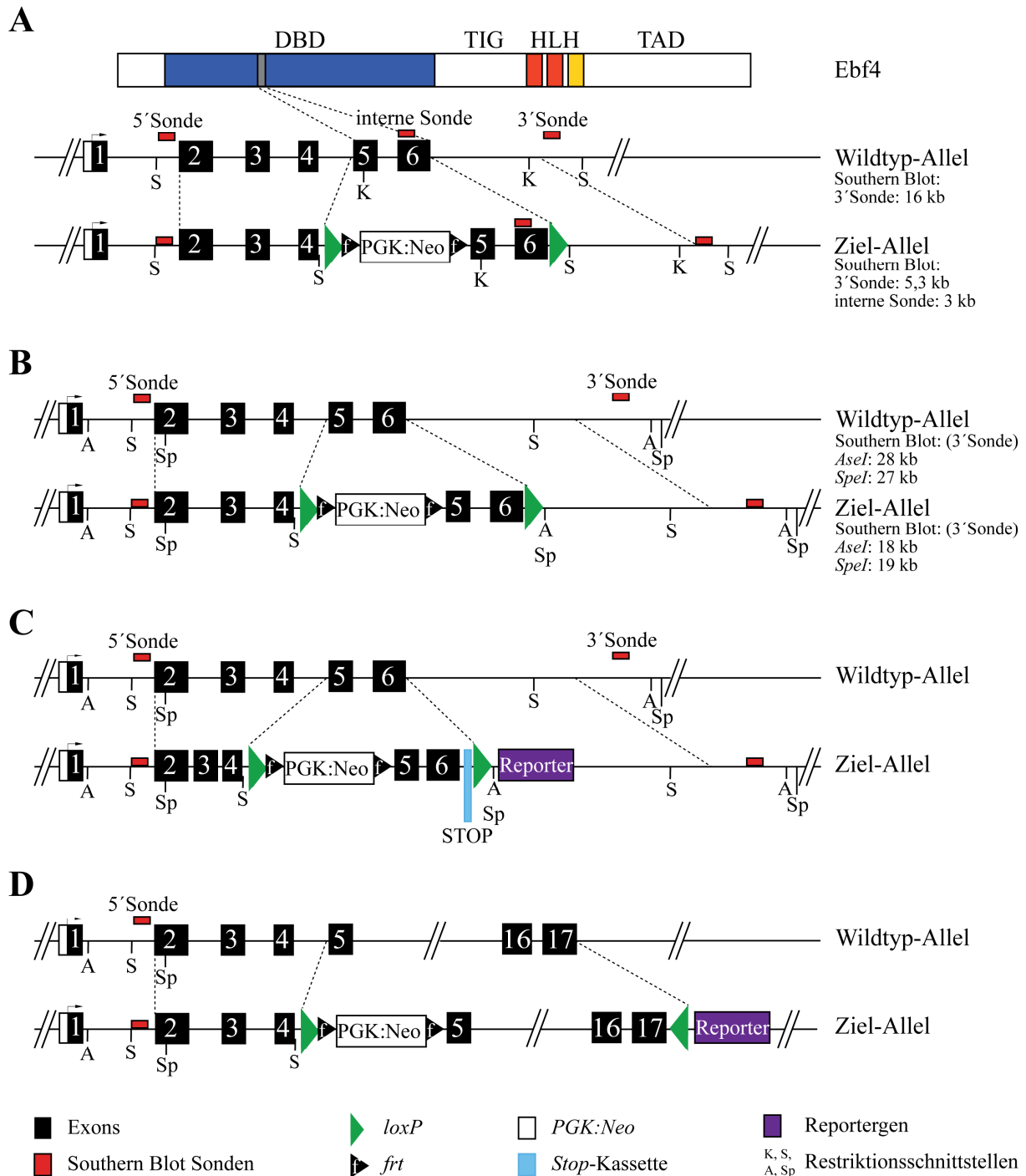
In den Expressionsstudien konnte in Übereinstimmung mit publizierten Daten für *Ebf4* eine Expression sowohl im Auge (Jin *et al.*, 2010), als auch in Gehirn, Lunge, Milz und Niere (Wang *et al.*, 2002) detektiert werden (Abb. 3.11). Zusätzlich wurde in dieser Arbeit aus ungeklärten Gründen in Diskrepanz zu Wang *et al.* (2002) *Ebf4* auch in Herz und Testis detektiert. Weiterhin wurde eine *Ebf4*-Expression in Knochen und Haut ermittelt. *Ebf4* war zudem ähnlich der Expression von *Ebf1*, 2 und 3, (Ackerblad *et al.*, 2002; Jimenez *et al.*, 2007; Hesslein *et al.*, 2009) in osteoblastären und adipozytären Zellen exprimiert (Abb. 3.14). Hierbei wurde gezeigt, dass die Expression im Gegensatz zu *Ebf1* (Kieslinger *et al.*, 2005) vor allem in nicht-hämatopoetischen Zellen und in unreifen Osteoblasten zu finden war (Abb. 3.12, Abb. 3.13). Erst ab E11.5 pc konnte *Ebf4* vor allem in neuralen Geweben, wie dem zentralen Nervensystem, und später in mesenchymalen Geweben, wie den Beinanlagen,

detektiert werden (Abb. 3.10, Abb. 3.15). Von Mella *et al.* (2004) wurde publiziert, dass *Ebf4* nicht in den mesenchymalen Zellen der Beinanlagen exprimiert ist. Da in dieser Publikation die Expression ausschließlich in den Stadien E10.5 bis E14.5 pc untersucht wurde und auch in unseren Analysen in diesen Stadien keine Expression in den Beinanlagen entdeckt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass *Ebf4* in diesen Geweben erst in späteren embryonalen Stadien exprimiert wird.

Zusammenfassen kann gesagt werden, dass *Ebf4* über ein komplexes Expressionsmuster verfügt, welches großteils überlappend mit den anderen Faktoren auftritt (Jin *et al.*, 2010). Dennoch scheint der Faktor entgegen der von Wang *et al.* (2002) publizierten Vermutung kein Negativ-Regulator der Transaktivierung der anderen Ebf-Proteine zu sein.

#### **4.4 Optimierung der Deletions-Strategie für *Ebf4***

Nach wie vor wäre es deshalb interessant, die biologische Rolle von *Ebf4* mit Hilfe eines Deletions-Modelles zu untersuchen. Da das Gen für eine komplette konditionale Strategie zu groß ist, sollte das Gen partiell deletiert werden (Abb. 3.16). Mit Hilfe der in dieser Arbeit etablierten Strategie konnten mit einer Rekombinationsfrequenz von 8 % positive Klone bezüglich der Integration der 5'loxP-Sequenz ermittelt werden. Nach der Analyse der homologen Rekombination der 3'loxP-Sequenz in die endogene Region des *Ebf4*-Gens konnten jedoch keine positiven Klone detektiert werden (Abb. 3.17). Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass die Rekombination nur zwischen den Gensequenzen des linken Homologiearm (LHA) und der Zielregion stattgefunden hatte. Da somit die Strategie bezüglich der 5'loxP-Integration funktioniert hatte (3.4.3), sollten die Länge des LHA und die Lage der 5'loxP-Sequenz beibehalten werden. Eine Begünstigung der homologen Rekombination des rechten Homologiearms (RHA) durch Verkürzung der Zielsequenz ist nach der Analyse der konservierten Strukturen nicht durchführbar (Abb. 3.16). Es wäre jedoch möglich, unter Beibehaltung der bereits bestehenden 3'Sonde die Sequenz des RHA um 1,7 kb zu verlängern (Abb. 4.2A). Hierzu sollte jedoch die zusätzlich eingefügte *KpnI*-Restriktionsschnittstelle durch eine *ScaI*-Restriktionsschnittstelle ersetzt werden. In der Southern Blot Analyse ergäbe dies ein Signal von 5,3 kb. Weiterhin könnte bei dieser Strategie eine interne Sonde etabliert werden, mit welcher auch eventuell zufällige Integrationen im Genom ausgeschlossen werden könnten.



**Abb. 4. 2 Möglichkeiten der Optimierung der *Ebf4*-Deletions-Strategie.**

Schema der konditionalen Deletion von *Ebf4*. Gezeigt sind die ersten 6 kodierenden Exons und die Lage der möglichen endogenen Sonden (rot) des Southern Blots. Mit Pfeilköpfen sind Orientierung und Lage der *loxP*- (grün) sowie *frit*-Sequenzen (schwarz) eingezeichnet. Die Lage der PGK:Neo-Kassette (Neomycin-Resistenzkassette) wurde gekennzeichnet. Mit gestrichelten Linien wurden die jeweils korrespondierenden Teile der genomischen DNA skizziert. Gezeigt sind die Situationen des Wildtyp-Allels und des Ziel-Allels. In (A) wird die Möglichkeit gezeigt, durch Ersatz der *KpnI*-Restriktionsschnittstelle mit einer *ScaI*-Schnittstelle weiterhin die bereits etablierte 3'Sonde zu nutzen. In (B) ist die mögliche Nutzung der Restriktionsschnittstellen für *AseI* oder *SpeI* und eine mögliche Verlängerung des rechten Homologiearmes veranschaulicht. (C) und (D) zeigen zwei mögliche Integrations-Strategien eines Reportergens. K, *KpnI*; S, *ScaI*; A, *AseI*; Sp, *SpeI*.

Ebenso gäbe es jedoch auch die Möglichkeit von der bisherigen Strategie abzuweichen. Nach persönlicher Kommunikation mit Herrn Dr. M. Schmidt-Supprian (MPI für Biochemie,

Martinsried) existieren 12 für eine konventionelle Strategie geeignete Restriktionsschnittstellen: *AseI*, *BamHI*, *BglI*, *BglIII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *KpnI*, *NcoI*, *PstI*, *ScaI* und *SpeI*. Nach einer erneuten Sequenzanalyse kommen jedoch außer den bereits verwendeten Restriktionsschnittstellen für *KpnI* und *ScaI* nur zwei weitere Schnittstellen in Frage. Somit bestünde die Gelegenheit, den RHA unter Beachtung der daraus resultierenden Plasmidgröße um mehrere kb zu verlängern und die endogenen Restriktionsschnittstellen für *AseI* und *SpeI* zu nutzen (Abb. 4.2B). Ein Problem dieser Strategie ist jedoch, dass die Produkte aufgrund ihres ähnlichen Laufverhaltens im Southern Blot schwer zu unterscheiden wären.

Ein weiterer Aspekt, der in Betracht gezogen werden sollte, ist die zusätzliche Integration eines Reportergens wie *GFP* oder *lacZ*, wie sie in den konventionellen Deletions-Strategien für *Ebf2* und *Ebf3* genutzt wurden (Wang *et al.*, 2004; M. Garcia-Dominguez und P. Charnay, Institut der Biologie, Ecole Normale Supérieure, Paris). Hiermit könnte die Lokalisation und Analyse von *Ebf4* vereinfacht werden. So bestünde z.B. die Möglichkeit, eine Stop-Sequenz nach der Zielsequenz innerhalb der *loxP*-Sequenzen zu platzieren, wodurch es nachfolgend an die Cre-Rekombination zu einer Transkription und damit Aktivierung des Reportergens käme (Abb. 4.2C). Ein Nachteil wäre jedoch eine Verminderung der Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination zwischen RHA und endogenem Locus, da eine weitere nicht-homologe Sequenz in dem *Targeting*-Vektor wäre. Zudem müsste in funktionellen Analysen getestet werden, ob das im Intron gelegene Reportergen über Spleißmechanismen eventuell trotz Stop-Kassette transkribiert wird und anschließend als Teil des *Ebf4*-Proteins zu einer veränderten Expression des endogenen Gens führt.

Weiterhin wäre es denkbar, gegenständige *loxP*-Sequenzen zu nutzen, da in diesem Fall die Cre-Rekombinase die zwischen ihnen liegende Sequenz nicht als zirkuläres Fragment aus der DNA schneidet, sondern die Sequenz invertiert (Kano *et al.*, 1998; Lam und Rajewsky, 1998). So könnte in zwei homologen Rekombinations-Schritten eine *loxP*-Sequenz in das vierte Intron gesetzt werden und anschließend an die genomische DNA des Gens eine invertierte Reporterkassette (IRES-Gfp) sowie nachfolgend eine gegenständige *loxP*-Sequenz eingefügt werden. Wenn anschließend die Cre-Rekombinase zugefügt würde, könnte die zwischen den *loxP*-Sequenzen liegende DNA invertiert werden und damit würde nicht nur die Deletion des Gens erfolgen, sondern auch die Transkription des Reportergens (Abb. 4.2D). Ein entsprechender Vektor wurde durch Dr. Lothar Strobl bereits entwickelt (persönliche Kommunikation; HMGU München). Von Vorteil ist, dass bereits 22 Klone mit Insertion der 5' *loxP*-Sequenz (3.4.3) vorhanden sind, womit nur noch eine der zwei homologen

Rekombinationen vonnöten wäre. Nachteil wäre jedoch, dass die Rekombinationsfrequenz der Cre-Rekombinase durch die Entfernung der *loxP*-Sequenzen herabgesetzt würde (persönliche Kommunikation Dr. Ursula Zimmer-Strobl, HMGU München). Auch hier sollten in anschließenden funktionellen Analysen eventuelle Spleißmechanismen ausgeschlossen werden, um nicht ein artifizielles Ebf4-Protein zu erhalten.

Zusammengefasst sollte die unter Abb. 4.2A aufgeführte Deletions-Strategie aufgrund bereits etablierten Sonden und partiell etabliertem *Targeting*-Vektor gegenüber den anderen Strategien vorzuziehen sein.

Unabhängig von der gewählten Strategie sollte die *Longrange*-PCR zusätzlich durchgeführt werden, da mit dieser auch gleichzeitig eventuelle Mutationen der *loxP*-Sequenzen ausgeschlossen werden könnten. Die etablierte PCR zur Genotypisierung der ES-Zellen und später der Tiere könnte ebenfalls in der vorliegenden Form weiter verwendet werden, da die Primer in den benachbarten Regionen der 5' *loxP*-Sequenz binden (Abb. 3.17).

Nicht nur die Strategie selbst, sondern auch die homologe Rekombination sollte optimiert werden. Nach persönlicher Kommunikation mit Christoph Hinzen (HMGU München) lag diese bei der konditionalen Deletion von *Ebf2* bei ca. 0,5 %. Demnach sollte auch die Anzahl der expandierten ES-Zell-Klone erhöht werden, um eine höhere Ausbeute an korrekten Klonen zu erhalten.

## REFERENZEN

- Adams, B., P. Dorfler, A. Aguzzi, Z. Kozmik, P. Urbanek, I. Maurer-Fogy, and M. Busslinger. 1992. Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes Dev.* 6:1589-1607.
- Akerblad, P., U. Lind, D. Liberg, K. Bamberg, and M. Sigvardsson. 2002. Early B-cell factor (O/E-1) is a promoter of adipogenesis and involved in control of genes important for terminal adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol.* 22:8015-8025.
- Akerblad, P., M. Rosberg, T. Leanderson, and M. Sigvardsson. 1999. The B29 (immunoglobulin beta-chain) gene is a genetic target for early B-cell factor. *Mol Cell Biol.* 19:392-401.
- Aravind, L., and E.V. Koonin. 1999. Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches. *J Mol Biol.* 287:1023-1040.
- Artigiani, S., P.M. Comoglio, and L. Tamagnone. 1999. Plexins, semaphorins, and scatter factor receptors: a common root for cell guidance signals? *IUBMB Life.* 48:477-482.
- Asahi, M., H. Nakayama, M. Tada, and K. Otsu. 2003a. Regulation of sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> adenosine triphosphatase by phospholamban and sarcolipin: implication for cardiac hypertrophy and failure. *Trends Cardiovasc Med.* 13:152-157.
- Asahi, M., Y. Sugita, K. Kurzydowski, S. De Leon, M. Tada, C. Toyoshima, and D.H. MacLennan. 2003b. Sarcolipin regulates sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) by binding to transmembrane helices alone or in association with phospholamban. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:5040-5045.
- Augello, A., T.B. Kurth, and C. De Bari. 2010. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater.* 20:121-133.
- Bain, G., E.C. Maandag, D.J. Izon, D. Amsen, A.M. Kruisbeek, B.C. Weintraub, I. Krop, M.S. Schlissel, A.J. Feeney, M. van Roon, and et al. 1994. E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell.* 79:885-892.
- Bajard, L., F. Relaix, M. Lagha, D. Rocancourt, P. Daubas, and M.E. Buckingham. 2006. A novel genetic hierarchy functions during hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb. *Genes Dev.* 20:2450-2464.
- Bally-Cuif, L., L. Dubois, and A. Vincent. 1998. Molecular cloning of Zcoe2, the zebrafish homolog of Xenopus Xcoe2 and mouse EBF-2, and its expression during primary neurogenesis. *Mech Dev.* 77:85-90.

- Baron, R. 2004. Arming the osteoclast. *Nat Med.* 10:458-460.
- Benders, A.A., J.H. Veerkamp, A. Oosterhof, P.J. Jongen, R.J. Bindels, L.M. Smit, H.F. Busch, and R.A. Wevers. 1994. Ca<sup>2+</sup> homeostasis in Brody's disease. A study in skeletal muscle and cultured muscle cells and the effects of dantrolene and verapamil. *J Clin Invest.* 94:741-748.
- Bers, D.M., and J.H. Bridge. 1989. Relaxation of rabbit ventricular muscle by Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum calcium pump. Ryanodine and voltage sensitivity. *Circ Res.* 65:334-342.
- Birchmeier, C., and H. Brohmann. 2000. Genes that control the development of migrating muscle precursor cells. *Curr Opin Cell Biol.* 12:725-730.
- Bork, P., T. Doerks, T.A. Springer, and B. Snel. 1999. Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci.* 24:261-263.
- Brandl, C.J., S. deLeon, D.R. Martin, and D.H. MacLennan. 1987. Adult forms of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem.* 262:3768-3774.
- Brandl, C.J., N.M. Green, B. Korczak, and D.H. MacLennan. 1986. Two Ca<sup>2+</sup> ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell.* 44:597-607.
- Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 77:71-94.
- Brent, A.E., R. Schweitzer, and C.J. Tabin. 2003. A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell.* 113:235-248.
- Brody, I.A. 1969. Muscle contracture induced by exercise. A syndrome attributable to decreased relaxing factor. *N Engl J Med.* 281:187-192.
- Brunelli, S., F. Relaix, S. Baesso, M. Buckingham, and G. Cossu. 2007. Beta catenin-independent activation of MyoD in presomitic mesoderm requires PKC and depends on Pax3 transcriptional activity. *Dev Biol.* 304:604-614.
- Buckingham, M. 2001. Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 11:440-448.
- Buckingham, M. 2007. Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes. *C R Biol.* 330:530-533.
- Burk, S.E., J. Lytton, D.H. MacLennan, and G.E. Shull. 1989. cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca<sup>2+</sup> pump. *J Biol Chem.* 264:18561-18568.

- Busslinger, M. 2004. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol.* 22:55-79.
- Calvi, L.M., G.B. Adams, K.W. Weibrecht, J.M. Weber, D.P. Olson, M.C. Knight, R.P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F.R. Bringhurst, L.A. Milner, H.M. Kronenberg, and D.T. Scadden. 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 425:841-846.
- Carafoli, E. 1987. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem.* 56:395-433.
- Chen, X., S.T. Cheung, S. So, S.T. Fan, C. Barry, J. Higgins, K.M. Lai, J. Ji, S. Dudoit, I.O. Ng, M. Van De Rijn, D. Botstein, and P.O. Brown. 2002. Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell.* 13:1929-1939.
- Chen, Y., and P.A. Rice. 2003. New insight into site-specific recombination from Flp recombinase-DNA structures. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 32:135-159.
- Chevallier, A.K., M., Mauger, A., Sengel, P. 1977. Developmental fate of the somitic mesoderm in the chick embryo. In "Vertebrate Limb and Somite Morphogenesis."
- Christ, B., R. Huang, and M. Scaal. 2007. Amniote somite derivatives. *Dev Dyn.* 236:2382-2396.
- Christ, B., and C.P. Ordahl. 1995. Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl).* 191:381-396.
- Coffman, R.L., and I.L. Weissman. 1981. B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. *Nature.* 289:681-683.
- Corradi, A., L. Croci, V. Broccoli, S. Zecchini, S. Previtali, W. Wurst, S. Amadio, R. Maggi, A. Quattrini, and G.G. Consalez. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in Ebf2-null mice. *Development.* 130:401-410.
- Crozatier, M., D. Valle, L. Dubois, S. Ibnsouda, and A. Vincent. 1996. Collier, a novel regulator of Drosophila head development, is expressed in a single mitotic domain. *Curr Biol.* 6:707-718.
- Crozatier, M., D. Valle, L. Dubois, S. Ibnsouda, and A. Vincent. 1999. Head versus trunk patterning in the Drosophila embryo; collier requirement for formation of the intercalary segment. *Development.* 126:4385-4394.
- Crozatier, M., and A. Vincent. 1999. Requirement for the Drosophila COE transcription factor Collier in formation of an embryonic muscle: transcriptional response to notch signalling. *Development.* 126:1495-1504.



- Daburon, V., S. Mella, J.L. Plouhinec, S. Mazan, M. Crozatier, and A. Vincent. 2008. The metazoan history of the COE transcription factors. Selection of a variant HLH motif by mandatory inclusion of a duplicated exon in vertebrates. *BMC Evol Biol.* 8:131.
- DeKoter, R.P., H.J. Lee, and H. Singh. 2002. PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity.* 16:297-309.
- DeKoter, R.P., and H. Singh. 2000. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science.* 288:1439-1441.
- DeKoter, R.P., J.C. Walsh, and H. Singh. 1998. PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *Embo J.* 17:4456-4468.
- Domen, J., and I.L. Weissman. 1999. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol Med Today.* 5:201-208.
- Dubois, L., L. Bally-Cuif, M. Crozatier, J. Moreau, L. Paquereau, and A. Vincent. 1998. XCoe2, a transcription factor of the Col/Olf-1/EBF family involved in the specification of primary neurons in *Xenopus*. *Curr Biol.* 8:199-209.
- Dubois, L., J. Enriquez, V. Daburon, F. Crozet, G. Lebreton, M. Crozatier, and A. Vincent. 2007. Collier transcription in a single *Drosophila* muscle lineage: the combinatorial control of muscle identity. *Development.* 134:4347-4355.
- Feldhaus, A.L., D. Mbangkollo, K.L. Arvin, C.A. Klug, and H. Singh. 1992. BLyF, a novel cell-type- and stage-specific regulator of the B-lymphocyte gene mb-1. *Mol Cell Biol.* 12:1126-1133.
- Fields, S., K. Ternyak, H. Gao, R. Ostraat, J. Akerlund, and J. Hagman. 2008. The 'zinc knuckle' motif of Early B cell Factor is required for transcriptional activation of B cell-specific genes. *Mol Immunol.* 45:3786-3796.
- Friedenstein, A.J. 1976. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol.* 47:327-359.
- Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3:393-403.
- Friedrich, O., E. Hund, C. Weber, W. Hacke, and R.H. Fink. 2004. Critical illness myopathy serum fractions affect membrane excitability and intracellular calcium release in mammalian skeletal muscle. *J Neurol.* 251:53-65.
- Friedrich, O., F. von Wegner, J.S. Chamberlain, R.H. Fink, and P. Rohrbach. 2008. L-type Ca<sup>2+</sup> channel function is linked to dystrophin expression in mammalian muscle. *PLoS One.* 3:e1762.

- Fuchs, E., and K. Weber. 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 63:345-382.
- Gall, J.G., and M.L. Pardue. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 63:378-383.
- Garel, S., M. Garcia-Dominguez, and P. Charnay. 2000. Control of the migratory pathway of facial branchiomotor neurones. *Development.* 127:5297-5307.
- Garel, S., F. Marin, R. Grosschedl, and P. Charnay. 1999. Ebf1 controls early cell differentiation in the embryonic striatum. *Development.* 126:5285-5294.
- Garel, S., F. Marin, M.G. Mattei, C. Vesque, A. Vincent, and P. Charnay. 1997. Family of Ebf/Olf-1-related genes potentially involved in neuronal differentiation and regional specification in the central nervous system. *Dev Dyn.* 210:191-205.
- Giffin, M.J., J.C. Stroud, D.L. Bates, K.D. von Koenig, J. Hardin, and L. Chen. 2003. Structure of NFAT1 bound as a dimer to the HIV-1 LTR kappa B element. *Nat Struct Biol.* 10:800-806.
- Goulding, M., A. Lumsden, and A.J. Paquette. 1994. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development.* 120:957-971.
- Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 36:59-74.
- Green, Y.S., and M.L. Vetter. 2011. EBF factors drive expression of multiple classes of target genes governing neuronal development. *Neural Dev.* 6:19.
- Greenbaum, S., and Y. Zhuang. 2002. Regulation of early lymphocyte development by E2A family proteins. *Semin Immunol.* 14:405-414.
- Hagman, J., C. Belanger, A. Travis, C.W. Turck, and R. Grosschedl. 1993. Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression. *Genes Dev.* 7:760-773.
- Hagman, J., M.J. Gutch, H. Lin, and R. Grosschedl. 1995. EBF contains a novel zinc coordination motif and multiple dimerization and transcriptional activation domains. *Embo J.* 14:2907-2916.
- Hagman, J., A. Travis, and R. Grosschedl. 1991. A novel lineage-specific nuclear factor regulates mb-1 gene transcription at the early stages of B cell differentiation. *Embo J.* 10:3409-3417.
- Haldar, M., G. Karan, P. Tvrdik, and M.R. Capecchi. 2008. Two cell lineages, myf5 and myf5-independent, participate in mouse skeletal myogenesis. *Dev Cell.* 14:437-445.

- Hardy, R.R., C.E. Carmack, S.A. Shinton, J.D. Kemp, and K. Hayakawa. 1991. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med.* 173:1213-1225.
- Harper, J.W., G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S.J. Elledge. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* 75:805-816.
- Hasty, P., A. Bradley, J.H. Morris, D.G. Edmondson, J.M. Venuti, E.N. Olson, and W.H. Klein. 1993. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature.* 364:501-506.
- Hesslein, D.G., J.A. Fretz, Y. Xi, T. Nelson, S. Zhou, J.A. Lorenzo, D.G. Schatz, and M.C. Horowitz. 2009. Ebf1-dependent control of the osteoblast and adipocyte lineages. *Bone.* 44:537-546.
- Hiechinger, S. 2010. Die Rolle von EBF2 in der haematopoietischen Stammzellnische. In Fakultät für Biologie. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Hitz, C., W. Wurst, and R. Kuhn. 2007. Conditional brain-specific knockdown of MAPK using Cre/loxP regulated RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 35:e90.
- Igarashi, H., S.C. Gregory, T. Yokota, N. Sakaguchi, and P.W. Kincade. 2002. Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity.* 17:117-130.
- Inesi, G., D. Lewis, C. Sumbilla, A. Nandi, C. Strock, K.W. Huff, T.B. Rogers, D.C. Johns, P.D. Kessler, and C.P. Ordahl. 1998. Cell-specific promoter in adenovirus vector for transgenic expression of SERCA1 ATPase in cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 274:C645-653.
- Ishikawa, H., R. Bischoff, and H. Holtzer. 1968. Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J Cell Biol.* 38:538-555.
- Jewett, P.H., J.R. Sommer, and E.A. Johnson. 1971. Cardiac muscle. Its ultrastructure in the finch and hummingbird with special reference to the sarcoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 49:50-65.
- Jiang, Y., B.N. Jahagirdar, R.L. Reinhardt, R.E. Schwartz, C.D. Keene, X.R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W.C. Low, D.A. Largaespada, and C.M. Verfaillie. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 418:41-49.
- Jimenez, M.A., P. Akerblad, M. Sigvardsson, and E.D. Rosen. 2007. Critical role for Ebf1 and Ebf2 in the adipogenic transcriptional cascade. *Mol Cell Biol.* 27:743-757.

- Jin, K., H. Jiang, Z. Mo, and M. Xiang. 2010. Early B-cell factors are required for specifying multiple retinal cell types and subtypes from postmitotic precursors. *J Neurosci.* 30:11902-11916.
- Jones, S., X. Zhang, D.W. Parsons, J.C. Lin, R.J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, H. Kamiyama, A. Jimeno, S.M. Hong, B. Fu, M.T. Lin, E.S. Calhoun, M. Kamiyama, K. Walter, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, J. Hartigan, D.R. Smith, M. Hidalgo, S.D. Leach, A.P. Klein, E.M. Jaffee, M. Goggins, A. Maitra, C. Iacobuzio-Donahue, J.R. Eshleman, S.E. Kern, R.H. Hruban, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V.E. Velculescu, and K.W. Kinzler. 2008. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science.* 321:1801-1806.
- Jorgensen, A.O., W. Arnold, D.R. Pepper, S.D. Kahl, F. Mandel, and K.P. Campbell. 1988. A monoclonal antibody to the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum cross-reacts with slow type I but not with fast type II canine skeletal muscle fibers: an immunocytochemical and immunochemical study. *Cell Motil Cytoskeleton.* 9:164-174.
- Kablar, B., K. Krastel, S. Tajbakhsh, and M.A. Rudnicki. 2003. Myf5 and MyoD activation define independent myogenic compartments during embryonic development. *Dev Biol.* 258:307-318.
- Kano, M., H. Igarashi, I. Saito, and M. Masuda. 1998. Cre-loxP-mediated DNA flip-flop in mammalian cells leading to alternate expression of retrovirally transduced genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 248:806-811.
- Kargacin, M.E., and G.J. Kargacin. 1994. Methods for determining cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump kinetics from fura 2 measurements. *Am J Physiol.* 267:C1145-1151.
- Karpati, G., J. Charuk, S. Carpenter, C. Jablecki, and P. Holland. 1986. Myopathy caused by a deficiency of Ca<sup>2+</sup>-adenosine triphosphatase in sarcoplasmic reticulum (Brody's disease). *Ann Neurol.* 20:38-49.
- Karpati, G., and D.H. MacLennan. 1999. Exercise Intolerance and Muscle Contracture.
- Karsenty, G., and E.F. Wagner. 2002. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell.* 2:389-406.
- Kaufman, M.H. 1992. The Atlas of Mouse Development.
- Kee, B.L., and C. Murre. 1998. Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12. *J Exp Med.* 188:699-713.

- Kieslinger, M., S. Folberth, G. Dobрева, T. Dorn, L. Croci, R. Erben, G.G. Consalez, and R. Grosschedl. 2005. EBF2 regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 9:757-767.
- Kieslinger, M., S. Hiechinger, G. Dobрева, G.G. Consalez, and R. Grosschedl. 2010. Early B cell factor 2 regulates hematopoietic stem cell homeostasis in a cell-nonautonomous manner. *Cell Stem Cell*. 7:496-507.
- Kim, J., S.Y. Min, H.E. Lee, and W.H. Kim. 2011. Aberrant DNA methylation and tumor suppressive activity of the EBF3 gene in gastric carcinoma. *Int J Cancer*.
- Kodama, H.A., Y., Sudo, H.; Yamamoto, S. 1981. Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn. J. Oral Biol*. 23:899-901.
- Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 91:661-672.
- Kuhn, R., F. Schwenk, M. Aguet, and K. Rajewsky. 1995. Inducible gene targeting in mice. *Science*. 269:1427-1429.
- Kuhn, R., and R.M. Torres. 2002. Cre/loxP recombination system and gene targeting. *Methods Mol Biol*. 180:175-204.
- Kwon, K., C. Hutter, Q. Sun, I. Bilic, C. Cobaleda, S. Malin, and M. Busslinger. 2008. Instructive role of the transcription factor E2A in early B lymphopoiesis and germinal center B cell development. *Immunity*. 28:751-762.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lalli, M.J., J. Yong, V. Prasad, K. Hashimoto, D. Plank, G.J. Babu, D. Kirkpatrick, R.A. Walsh, M. Sussman, A. Yatani, E. Marban, and M. Periasamy. 2001. Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) atpase (SERCA) 1a structurally substitutes for SERCA2a in the cardiac sarcoplasmic reticulum and increases cardiac Ca(2+) handling capacity. *Circ Res*. 89:160-167.
- Lam, K.P., and K. Rajewsky. 1998. Rapid elimination of mature autoreactive B cells demonstrated by Cre-induced change in B cell antigen receptor specificity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:13171-13175.
- Lazarides, E., and B.D. Hubbard. 1976. Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73:4344-4348.
- Lepper, C., S.J. Conway, and C.M. Fan. 2009. Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. *Nature*. 460:627-631.

- Li, Y.S., K. Hayakawa, and R.R. Hardy. 1993. The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *J Exp Med.* 178:951-960.
- Liberg, D., M. Sigvardsson, and P. Akerblad. 2002. The EBF/Olf/Collier family of transcription factors: regulators of differentiation in cells originating from all three embryonal germ layers. *Mol Cell Biol.* 22:8389-8397.
- Lin, H., and R. Grosschedl. 1995. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature.* 376:263-267.
- Lobo, M.K., C. Yeh, and X.W. Yang. 2008. Pivotal role of early B-cell factor 1 in development of striatonigral medium spiny neurons in the matrix compartment. *J Neurosci Res.* 86:2134-2146.
- Lord, B.I., N.G. Testa, and J.H. Hendry. 1975. The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood.* 46:65-72.
- Ludolph, D.C., and S.F. Konieczny. 1995. Transcription factor families: muscling in on the myogenic program. *Faseb J.* 9:1595-1604.
- Lytton, J., M. Westlin, S.E. Burk, G.E. Shull, and D.H. MacLennan. 1992. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem.* 267:14483-14489.
- MacLennan, D.H., C.J. Brandl, B. Korczak, and N.M. Green. 1985. Amino-acid sequence of a  $\text{Ca}^{2+}$  +  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature.* 316:696-700.
- MacLennan, D.H., W.J. Rice, and N.M. Green. 1997. The mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$  transport by sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases. *J Biol Chem.* 272:28815-28818.
- Maier, H., R. Ostraat, H. Gao, S. Fields, S.A. Shinton, K.L. Medina, T. Ikawa, C. Murre, H. Singh, R.R. Hardy, and J. Hagman. 2004. Early B cell factor cooperates with Runx1 and mediates epigenetic changes associated with mb-1 transcription. *Nat Immunol.* 5:1069-1077.
- Malgaretti, N., O. Pozzoli, A. Bosetti, A. Corradi, S. Ciarmatori, M. Panigada, M.E. Bianchi, S. Martinez, and G.G. Consalez. 1997. Mmot1, a new helix-loop-helix transcription factor gene displaying a sharp expression boundary in the embryonic mouse brain. *J Biol Chem.* 272:17632-17639.
- Markowitz, D., S. Goff, and A. Bank. 1988. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J Virol.* 62:1120-1124.

- McCaffrey, P.G., C. Luo, T.K. Kerppola, J. Jain, T.M. Badalian, A.M. Ho, E. Burgeon, W.S. Lane, J.N. Lambert, T. Curran, and et al. 1993. Isolation of the cyclosporin-sensitive T cell transcription factor NFATp. *Science*. 262:750-754.
- Medina, K.L., J.M. Pongubala, K.L. Reddy, D.W. Lancki, R. Dekoter, M. Kieslinger, R. Grosschedl, and H. Singh. 2004. Assembling a gene regulatory network for specification of the B cell fate. *Dev Cell*. 7:607-617.
- Medina, K.L., and H. Singh. 2005. Gene regulatory networks orchestrating B cell fate specification, commitment, and differentiation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 290:1-14.
- Mella, S., C. Soula, D. Morello, M. Crozatier, and A. Vincent. 2004. Expression patterns of the coe/ebf transcription factor genes during chicken and mouse limb development. *Gene Expr Patterns*. 4:537-542.
- Michels, J., P.W. Johnson, and G. Packham. 2005. Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 37:267-271.
- Minamisawa, S., M. Hoshijima, G. Chu, C.A. Ward, K. Frank, Y. Gu, M.E. Martone, Y. Wang, J. Ross, Jr., E.G. Kranias, W.R. Giles, and K.R. Chien. 1999. Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell*. 99:313-322.
- Mintz, B., and W.W. Baker. 1967. Normal mammalian muscle differentiation and gene control of isocitrate dehydrogenase synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 58:592-598.
- Mitchell, K.J., A. Pannerec, B. Cadot, A. Parlakian, V. Besson, E.R. Gomes, G. Marazzi, and D.A. Sassoon. 2010. Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat Cell Biol*. 12:257-266.
- Moore, K.A., H. Ema, and I.R. Lemischka. 1997. In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood*. 89:4337-4347.
- Morrison, S.J., and I.L. Weissman. 1994. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*. 1:661-673.
- Murre, C., P.S. McCaw, and D. Baltimore. 1989a. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell*. 56:777-783.
- Murre, C., P.S. McCaw, H. Vaessin, M. Caudy, L.Y. Jan, Y.N. Jan, C.V. Cabrera, J.N. Buskin, S.D. Hauschka, A.B. Lassar, and et al. 1989b. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*. 58:537-544.

- Nabeshima, Y., K. Hanaoka, M. Hayasaka, E. Esumi, S. Li, and I. Nonaka. 1993. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature*. 364:532-535.
- Nestoras, K., H. Lee, and J. Mohler. 1997. Role of knot (kn) in wing patterning in *Drosophila*. *Genetics*. 147:1203-1212.
- Neve, R.M., K. Chin, J. Fridlyand, J. Yeh, F.L. Baehner, T. Fevr, L. Clark, N. Bayani, J.P. Coppe, F. Tong, T. Speed, P.T. Spellman, S. DeVries, A. Lapuk, N.J. Wang, W.L. Kuo, J.L. Stilwell, D. Pinkel, D.G. Albertson, F.M. Waldman, F. McCormick, R.B. Dickson, M.D. Johnson, M. Lippman, S. Ethier, A. Gazdar, and J.W. Gray. 2006. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 10:515-527.
- Noh, O.J., Y.H. Park, Y.W. Chung, and I.Y. Kim. 2010. Transcriptional regulation of selenoprotein W by MyoD during early skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem*. 285:40496-40507.
- Nutt, S.L., and B.L. Kee. 2007. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity*. 26:715-725.
- Nutt, S.L., A.M. Morrison, P. Dorfler, A. Rolink, and M. Busslinger. 1998. Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *Embo J*. 17:2319-2333.
- O'Riordan, M., and R. Grosschedl. 1999. Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity*. 11:21-31.
- Odermatt, A., K. Barton, V.K. Khanna, J. Mathieu, D. Escolar, T. Kuntzer, G. Karpati, and D.H. MacLennan. 2000. The mutation of Pro789 to Leu reduces the activity of the fast-twitch skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA1) and is associated with Brody disease. *Hum Genet*. 106:482-491.
- Odermatt, A., S. Becker, V.K. Khanna, K. Kurzydowski, E. Leisner, D. Pette, and D.H. MacLennan. 1998. Sarcoplipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J Biol Chem*. 273:12360-12369.
- Odermatt, A., P.E. Taschner, V.K. Khanna, H.F. Busch, G. Karpati, C.K. Jablecki, M.H. Breuning, and D.H. MacLennan. 1996. Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase, are associated with Brody disease. *Nat Genet*. 14:191-194.
- Odermatt, A., P.E. Taschner, S.W. Scherer, B. Beatty, V.K. Khanna, D.R. Cornblath, V. Chaudhry, W.C. Yee, B. Schrank, G. Karpati, M.H. Breuning, N. Knoers, and D.H.



- MacLennan. 1997. Characterization of the gene encoding human sarcolipin (SLN), a proteolipid associated with SERCA1: absence of structural mutations in five patients with Brody disease. *Genomics*. 45:541-553.
- Oettinger, M.A., D.G. Schatz, C. Gorka, and D. Baltimore. 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*. 248:1517-1523.
- Ordahl, C.P., and N.M. Le Douarin. 1992. Two myogenic lineages within the developing somite. *Development*. 114:339-353.
- Osmond, D.G. 1990. B cell development in the bone marrow. *Semin Immunol*. 2:173-180.
- Osmond, D.G., N. Kim, R. Manoukian, R.A. Phillips, S.A. Rico-Vargas, and K. Jacobsen. 1992. Dynamics and localization of early B-lymphocyte precursor cells (pro-B cells) in the bone marrow of scid mice. *Blood*. 79:1695-1703.
- Paige, C.J., P.W. Kincade, and P. Ralph. 1978. Murine B cell leukemia line with inducible surface immunoglobulin expression. *J Immunol*. 121:641-647.
- Palacios, R., G. Henson, M. Steinmetz, and J.P. McKearn. 1984. Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro. *Nature*. 309:126-131.
- Pan, Y., E. Zvaritch, A.R. Tupling, W.J. Rice, S. de Leon, M. Rudnicki, C. McKerlie, B.L. Banwell, and D.H. MacLennan. 2003. Targeted disruption of the ATP2A1 gene encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase isoform 1 (SERCA1) impairs diaphragm function and is lethal in neonatal mice. *J Biol Chem*. 278:13367-13375.
- Pardue, M.L., and J.G. Gall. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 64:600-604.
- Parsons, D.W., S. Jones, X. Zhang, J.C. Lin, R.J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, I.M. Siu, G.L. Gallia, A. Olivi, R. McLendon, B.A. Rasheed, S. Keir, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, D.A. Busam, H. Tekleab, L.A. Diaz, Jr., J. Hartigan, D.R. Smith, R.L. Strausberg, S.K. Marie, S.M. Shinjo, H. Yan, G.J. Riggins, D.D. Bigner, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V.E. Velculescu, and K.W. Kinzler. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 321:1807-1812.
- Pasparakis, M., and G. Kollias. 1995. Production of cytokine transgenic and knockout mice. In *Cytokines: A Practical Approach*. 297–325 pp.
- Patapoutian, A., J.K. Yoon, J.H. Miner, S. Wang, K. Stark, and B. Wold. 1995. Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. *Development*. 121:3347-3358.

- Phinney, D.G. 2002. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem Suppl.* 38:7-12.
- Polyak, K., M.H. Lee, H. Erdjument-Bromage, A. Koff, J.M. Roberts, P. Tempst, and J. Massague. 1994. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell.* 78:59-66.
- Pourquie, O. 2000. Segmentation of the paraxial mesoderm and vertebrate somitogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 47:81-105.
- Pourquie, O. 2001. Vertebrate somitogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:311-350.
- Pownall, M.E., M.K. Gustafsson, and C.P. Emerson, Jr. 2002. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18:747-783.
- Pozzoli, O., A. Bosetti, L. Croci, G.G. Consalez, and M.L. Vetter. 2001. Xebf3 is a regulator of neuronal differentiation during primary neurogenesis in *Xenopus*. *Dev Biol.* 233:495-512.
- Prasad, B.C., B. Ye, R. Zackhary, K. Schrader, G. Seydoux, and R.R. Reed. 1998. unc-3, a gene required for axonal guidance in *Caenorhabditis elegans*, encodes a member of the O/E family of transcription factors. *Development.* 125:1561-1568.
- Rajewsky, K., H. Gu, R. Kuhn, U.A. Betz, W. Muller, J. Roes, and F. Schwenk. 1996. Conditional gene targeting. *J Clin Invest.* 98:600-603.
- Roessler, S., I. Gyory, S. Imhof, M. Spivakov, R.R. Williams, M. Busslinger, A.G. Fisher, and R. Grosschedl. 2007. Distinct promoters mediate the regulation of *Ebfl* gene expression by interleukin-7 and *Pax5*. *Mol Cell Biol.* 27:579-594.
- Rudnicki, M.A., T. Braun, S. Hinuma, and R. Jaenisch. 1992. Inactivation of *MyoD* in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene *Myf-5* and results in apparently normal muscle development. *Cell.* 71:383-390.
- Rugh, R. 1968. "The Mouse: Its Reproduction and Development."
- Sacchetti, B., A. Funari, S. Michienzi, S. Di Cesare, S. Piersanti, I. Saggio, E. Tagliafico, S. Ferrari, P.G. Robey, M. Riminucci, and P. Bianco. 2007. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* 131:324-336.
- Sambrook, J., Russel, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.
- Sassoon, D.A. 1993. Myogenic regulatory factors: dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis. *Dev Biol.* 156:11-23.

- Sauer, B., and N. Henderson. 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:5166-5170.
- Scherer, W.F., J.T. Syverton, and G.O. Gey. 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med.* 97:695-710.
- Scott, E.W., M.C. Simon, J. Anastasi, and H. Singh. 1994. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science.* 265:1573-1577.
- Sen, R., and D. Baltimore. 1986. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell.* 47:921-928.
- Short, B., N. Brouard, T. Occhiodoro-Scott, A. Ramakrishnan, and P.J. Simmons. 2003. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res.* 34:565-571.
- Shull, G.E. 2000. Gene knockout studies of Ca<sup>2+</sup>-transporting ATPases. *Eur J Biochem.* 267:5284-5290.
- Siden, E.J., D. Baltimore, D. Clark, and N.E. Rosenberg. 1979. Immunoglobulin synthesis by lymphoid cells transformed in vitro by Abelson murine leukemia virus. *Cell.* 16:389-396.
- Sigvardsson, M., D.R. Clark, D. Fitzsimmons, M. Doyle, P. Akerblad, T. Breslin, S. Bilke, R. Li, C. Yeaman, G. Zhang, and J. Hagman. 2002. Early B-cell factor, E2A, and Pax-5 cooperate to activate the early B cell-specific mb-1 promoter. *Mol Cell Biol.* 22:8539-8551.
- Sigvardsson, M., M. O'Riordan, and R. Grosschedl. 1997. EBF and E47 collaborate to induce expression of the endogenous immunoglobulin surrogate light chain genes. *Immunity.* 7:25-36.
- Silbernagl, S., and A. Despopoulos. 2003. Taschenatlas der Physiologie. 436 pp.
- Simmerman, H.K., and L.R. Jones. 1998. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev.* 78:921-947.
- Singh, H., K.L. Medina, and J.M. Pongubala. 2005. Contingent gene regulatory networks and B cell fate specification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:4949-4953.
- Siponen, M.I., M. Wisniewska, L. Lehtio, I. Johansson, L. Svensson, G. Raszewski, L. Nilsson, M. Sigvardsson, and H. Berglund. 2010. Structural determination of functional domains in early B-cell factor (EBF) family of transcription factors reveals similarities to Rel DNA-binding proteins and a novel dimerization motif. *J Biol Chem.* 285:25875-25879.

- Smith, A.G., J.K. Heath, D.D. Donaldson, G.G. Wong, J. Moreau, M. Stahl, and D. Rogers. 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. 336:688-690.
- Snow, M.H., and P.P. Tam. 1980. Timing in embryological development. *Nature*. 286:107.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. 98:503-517.
- Spangrude, G.J., S. Heimfeld, and I.L. Weissman. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 241:58-62.
- Spemann, H. 1938. "Embryonic Development and Induction."
- Sumbilla, C., M. Cavagna, L. Zhong, H. Ma, D. Lewis, I. Farrance, and G. Inesi. 1999. Comparison of SERCA1 and SERCA2a expressed in COS-1 cells and cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 277:H2381-2391.
- Sung, J.H., H.M. Yang, J.B. Park, G.S. Choi, J.W. Joh, C.H. Kwon, J.M. Chun, S.K. Lee, and S.J. Kim. 2008. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transplant Proc*. 40:2649-2654.
- Sweeney, L.J. 1998. Basic concept in embryology: A student's survival guide.
- Tajbakhsh, S., D. Rocancourt, G. Cossu, and M. Buckingham. 1997. Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell*. 89:127-138.
- Taylor, D.J., M.J. Brosnan, D.L. Arnold, P.J. Bore, P. Styles, J. Walton, and G.K. Radda. 1988. Ca<sup>2+</sup>-ATPase deficiency in a patient with an exertional muscle pain syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 51:1425-1433.
- Taylor, S.M., and P.A. Jones. 1979. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*. 17:771-779.
- Teichmann, M.D., F.V. Wegner, R.H. Fink, J.S. Chamberlain, B.S. Launikonis, B. Martinac, and O. Friedrich. 2008. Inhibitory control over Ca(2+) sparks via mechanosensitive channels is disrupted in dystrophin deficient muscle but restored by mini-dystrophin expression. *PLoS One*. 3:e3644.
- Teitelbaum, S.L., and F.P. Ross. 2003. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*. 4:638-649.
- Thayer, M.J., S.J. Tapscott, R.L. Davis, W.E. Wright, A.B. Lassar, and H. Weintraub. 1989. Positive autoregulation of the myogenic determination gene MyoD1. *Cell*. 58:241-248.
- Thomas, K.H., T.M. Wilkie, P. Tomashefsky, A.R. Bellve, and M.I. Simon. 1989. Differential gene expression during mouse spermatogenesis. *Biol Reprod*. 41:729-739.

- Thomas, M.L., and L. Lefrancois. 1988. Differential expression of the leucocyte-common antigen family. *Immunol Today*. 9:320-326.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:4350-4354.
- Travis, A., J. Hagman, and R. Grosschedl. 1991. Heterogeneously initiated transcription from the pre-B- and B-cell-specific mb-1 promoter: analysis of the requirement for upstream factor-binding sites and initiation site sequences. *Mol Cell Biol*. 11:5756-5766.
- Travis, A., J. Hagman, L. Hwang, and R. Grosschedl. 1993. Purification of early-B-cell factor and characterization of its DNA-binding specificity. *Mol Cell Biol*. 13:3392-3400.
- Treiber, N., T. Treiber, G. Zocher, and R. Grosschedl. 2010a. Structure of an Ebf1:DNA complex reveals unusual DNA recognition and structural homology with Rel proteins. *Genes Dev*. 24:2270-2275.
- Treiber, T., E.M. Mandel, S. Pott, I. Gyory, S. Firner, E.T. Liu, and R. Grosschedl. 2010b. Early B cell factor 1 regulates B cell gene networks by activation, repression, and transcription- independent poising of chromatin. *Immunity*. 32:714-725.
- Trowbridge, I.S., H.L. Ostergaard, and P. Johnson. 1991. CD45: a leukocyte-specific member of the protein tyrosine phosphatase family. *Biochim Biophys Acta*. 1095:46-56.
- Tsapogas, P., S. Zandi, J. Ahsberg, J. Zetterblad, E. Welinder, J.I. Jonsson, R. Mansson, H. Qian, and M. Sigvardsson. 2011. IL-7 mediates Ebf-1-dependent lineage restriction in early lymphoid progenitors. *Blood*. 118:1283-1290.
- Tseng, B.S., S.T. Cavin, F.W. Booth, E.N. Olson, M.C. Marin, T.J. McDonnell, and I.J. Butler. 2000. Pulmonary hypoplasia in the myogenin null mouse embryo. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 22:304-315.
- Tucker, K.L., Y. Wang, J. Dausman, and R. Jaenisch. 1997. A transgenic mouse strain expressing four drug-selectable marker genes. *Nucleic Acids Res*. 25:3745-3746.
- Vervoort, M., M. Crozatier, D. Valle, and A. Vincent. 1999. The COE transcription factor Collier is a mediator of short-range Hedgehog-induced patterning of the Drosophila wing. *Curr Biol*. 9:632-639.
- Vinson, C.R., and K.C. Garcia. 1992. Molecular model for DNA recognition by the family of basic-helix-loop-helix-zipper proteins. *New Biol*. 4:396-403.
- Wang, M.M., and R.R. Reed. 1993. Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature*. 364:121-126.

- Wang, Q., T. Stacy, M. Binder, M. Marin-Padilla, A.H. Sharpe, and N.A. Speck. 1996a. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:3444-3449.
- Wang, Q., T. Stacy, J.D. Miller, A.F. Lewis, T.L. Gu, X. Huang, J.H. Bushweller, J.C. Bories, F.W. Alt, G. Ryan, P.P. Liu, A. Wynshaw-Boris, M. Binder, M. Marin-Padilla, A.H. Sharpe, and N.A. Speck. 1996b. The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo. *Cell*. 87:697-708.
- Wang, S.S., A.G. Betz, and R.R. Reed. 2002. Cloning of a novel Olf-1/EBF-like gene, O/E-4, by degenerate oligo-based direct selection. *Mol Cell Neurosci*. 20:404-414.
- Wang, S.S., J.W. Lewcock, P. Feinstein, P. Mombaerts, and R.R. Reed. 2004. Genetic disruptions of O/E2 and O/E3 genes reveal involvement in olfactory receptor neuron projection. *Development*. 131:1377-1388.
- Wang, S.S., R.Y. Tsai, and R.R. Reed. 1997. The characterization of the Olf-1/EBF-like HLH transcription factor family: implications in olfactory gene regulation and neuronal development. *J Neurosci*. 17:4149-4158.
- Wang, X., H. Hisha, S. Taketani, Y. Adachi, Q. Li, W. Cui, Y. Cui, J. Wang, C. Song, T. Mizokami, S. Okazaki, T. Fan, H. Fan, Z. Lian, M.E. Gershwin, and S. Ikehara. 2006. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow. *Stem Cells*. 24:482-493.
- Warner, N.L., M.A. Moore, and D. Metcalf. 1969. A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB-c mice: cytology, karyotype, and muramidase content. *J Natl Cancer Inst*. 43:963-982.
- Wede, O.K., M. Lofgren, Z. Li, D. Paulin, and A. Arner. 2002. Mechanical function of intermediate filaments in arteries of different size examined using desmin deficient mice. *J Physiol*. 540:941-949.
- Whitlock, C.A., and O.N. Witte. 1982. Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79:3608-3612.
- Williams, R.L., D.J. Hilton, S. Pease, T.A. Willson, C.L. Stewart, D.P. Gearing, E.F. Wagner, D. Metcalf, N.A. Nicola, and N.M. Gough. 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*. 336:684-687.
- Wineman, J., K. Moore, I. Lemischka, and C. Muller-Sieburg. 1996. Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment: rare stromal elements maintain long-term repopulating stem cells. *Blood*. 87:4082-4090.

- Wu, K.D., and J. Lytton. 1993. Molecular cloning and quantification of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoforms in rat muscles. *Am J Physiol.* 264:C333-341.
- Wuytack, F., L. Raeymaekers, H. De Smedt, J.A. Eggermont, L. Missiaen, L. Van Den Bosch, S. De Jaegere, H. Verboomen, L. Plessers, and R. Casteels. 1992. Ca(2+)-transport ATPases and their regulation in muscle and brain. *Ann N Y Acad Sci.* 671:82-91.
- Yaffe, D., and O. Saxel. 1977. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 270:725-727.
- Zandi, S., R. Mansson, P. Tsapogas, J. Zetterblad, D. Bryder, and M. Sigvardsson. 2008. EBF1 is essential for B-lineage priming and establishment of a transcription factor network in common lymphoid progenitors. *J Immunol.* 181:3364-3372.
- Zardo, G., M.I. Tiirikainen, C. Hong, A. Misra, B.G. Feuerstein, S. Volik, C.C. Collins, K.R. Lamborn, A. Bollen, D. Pinkel, D.G. Albertson, and J.F. Costello. 2002. Integrated genomic and epigenomic analyses pinpoint biallelic gene inactivation in tumors. *Nat Genet.* 32:453-458.
- Zhang, J.M., L. Chen, M. Krause, A. Fire, and B.M. Paterson. 1999. Evolutionary conservation of MyoD function and differential utilization of E proteins. *Dev Biol.* 208:465-472.
- Zhang, Y., J. Fujii, M.S. Phillips, H.S. Chen, G. Karpati, W.C. Yee, B. Schrank, D.R. Cornblath, K.B. Boylan, and D.H. MacLennan. 1995. Characterization of cDNA and genomic DNA encoding SERCA1, the Ca(2+)-ATPase of human fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, and its elimination as a candidate gene for Brody disease. *Genomics.* 30:415-424.
- Zhao, L.Y., J. Liu, G.S. Sidhu, Y. Niu, Y. Liu, R. Wang, and D. Liao. 2004. Negative regulation of p53 functions by Daxx and the involvement of MDM2. *J Biol Chem.* 279:50566-50579.
- Zhao, L.Y., Y. Niu, A. Santiago, J. Liu, S.H. Albert, K.D. Robertson, and D. Liao. 2006. An EBF3-mediated transcriptional program that induces cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 66:9445-9452.
- Zhuang, Y., P. Soriano, and H. Weintraub. 1994. The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell.* 79:875-884.
- Zot, A.S., and J.D. Potter. 1987. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 16:535-559.

Blast. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

ClustalW2. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

ECRBrowser. <http://ecrbrowser.dcode.org>

Ensembl. <http://www.ensembl.org/index.html>

Primer3. <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>

Pubmed. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Sequenzierungs-Service. <http://ecom2.mwgdna.com/register/index.tcl>



## DANKSAGUNG

Ich möchte mich zunächst bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik bedanken, die durch ihre Tatkraft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen herzlichen Dank möchte ich an Herrn Dr. Matthias Kieslinger richten, der mir ermöglicht hat, diese interessante Promotionsarbeit in seinem Labor durchzuführen. Des Weiteren möchte ich mich für seine Bereitschaft bedanken, konstruktiv über meine Arbeit zu diskutieren, mich in den letzten Monaten zu unterstützen und die wichtigen Kooperationen für mein Projekt ins Leben zu rufen.

Insbesondere möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. Josef Mautner bedanken, der mich als mein Doktorvater einfach großartig unterstützt hat und mir während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Bei Frau Prof. Dr. Angelika Böttger möchte ich mich ganz besonders für die Unterstützung meines Thesis-Komitees und die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Herrn Prof. Dr. Heinrich Jung, Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß, Frau Prof. Dr. Bettina Kempkes und Frau Prof. Dr. Barbara Conradt möchte ich ganz herzlich für die Übernahme der Begutachtung danken.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Ulla Zimmer-Strobl und ihren Labormitgliedern, sowie Herrn Dr. Marc Schmidt-Supprian und den Mitarbeitern des Tierstalls (Martina, Michael, Dani, Franzi, Silke, Bine, Jasmin und Albert) im KMOLBI München. Sie alle haben mich in meinem Projekt zur Generierung transgener Mäuse tatkräftig unterstützt.

Vielen lieben Dank auch an unsere stets hilfreichen Kooperationspartner:

Dr. Ralf Kühn und Susanne Weidemann (Institut für Entwicklungsgenetik, HMGU München)

Dr. Manuela Schneider (Institut für Pathologie, LMU)

Dr. Daniela Vogt-Weisenhorn, Miriam Homburg und Florian Giesert (Institut für Entwicklungsgenetik, HMGU München)

Dr. Tanja Klein-Rodewald und Prof. Dr. Irene Esposito (Institut für Pathologie, HMGU München)

Prof. Dr. Rainer Fink, Dr. Matias Mosqueira, Moritz Förderer, Tihomir Georgiev und Cornelia Weber (Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg)

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen derzeitigen aber auch meinen ehemaligen Arbeitskollegen im Labor 145 für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft bedanken. Mein besonderer Dank geht dabei an Katharina Zettl, Torsten Willert, Silvia Hiechinger Christoph Hinzen und Gerald Burgstaller für ihre geduldige Hilfe und die vielen interessanten wissenschaftlichen Diskussionen.

Danke vor allem auch an Petra Kopp, durch die viele Aspekte dieser Arbeit in ein neues Licht gerückt wurden, und die mir dank ihrem Korrektur-Lesen mein Deutsch-Englisch ausgetrieben hat.

Besonders aber möchte ich meinen Dank an Inga Ludenberg richten. Wir haben gemeinsam diskutiert, gekämpft und sind Freundinnen geworden, die sich helfen und auch gerne bei Zitrontee und Tütensuppe Erkenntnisse der Wissenschaft austauschen... Danke Dir auch für Deine konstruktiven Verbesserungsvorschläge! Eine bessere Arbeits-Lebensabschnittsgefährtin gibt's nicht!

Vielen Dank auch an meinen fleissigen Korrektur-Leser Gabor Gondi. Deine Kritik war sehr hilfreich! Muchas gracias!

Ein außerordentlicher Dank gebührt Karl und meinen „Schwestern“ Julia und Doreen, die mich stets unterstützt haben und mir die nötige Kraft und Motivation gaben, meine Promotion zu bestehen. Ihr seid einfach die besten Freunde, die ich mir vorstellen kann!

Mein größter Dank gebührt jedoch meinen Eltern und meinem Bruder Stefan, die mich in allen Lebenslagen während meiner Promotion unterstützt haben, und ohne die auch mein Studium nicht möglich gewesen wäre. Danke, dass es euch gibt, ohne euch wäre ich nichts!

## CURRICULUM VITAE

### Persönliche Angabe

---

Vor- und Zuname: Bettina Groll

Geburtsdatum: 05.08.1981 in München

### Ausbildung, Studium

---

09/1992 – 06/2001 **Abitur**

Erasmus-Grasser-Gymnasium, München

10/2001 – 09/2006 **Diplom** Studiengang Diplom-Biologie

Technische Universität München, Verwaltungsstelle Weihenstephan

Hauptfach: Genetik

Nebenfächer: Immunologie, Virologie, Humanbiologie

### Promotion

---

06/2008 – 11/2011 **Doktorarbeit:** „*Charakterisierung der Ebf-Faktoren Ebf3 und Ebf4 in vivo und in vitro*“; Helmholtz-Zentrum München, Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik; Hämatologie; Arbeitsgruppe Dr. Matthias Kieslinger, Doktorvater: PD Dr. J. Mautner

04/2010 – 09/2011 **Promotion Biologie**

Ludwig-Maximilians-Universität München

## VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile dieser Arbeit wurden in der Dissertation von Inga Ludenberg erwähnt.

### Poster:

*9th B Cell Forum of the German Society of Immunology of the Study Group "Biology of B Lymphocytes", Bad Sooden-Allendorf, Deutschland, 2011*

Inga Ludenberg\*, **Bettina Groll\*** and Matthias Kieslinger

\*equal contribution

Titel: Redundancy of Ebf proteins in B cell development?

### Manuskripte in Vorbereitung:

- **Bettina Groll**, Gerald Burgstaller, Saihong Jin, Petra Kopp, Inga Ludenberg, Tanja Klein-Rodewald, Irene Esposito, Matias Mosqueira, Moritz Förderer, Tihomir Georgiev, Cornelia Weber, Rainer Fink, Mario Garcia-Dominguez, Patrick Charnay and Matthias Kieslinger  
*„Ebf3 participates in transcriptional control of murine muscle development and influences diaphragm function by regulating Atp2a1”*
- **Bettina Groll\***, Inga Ludenberg\*, Katharina Zettl and Matthias Kieslinger  
*„Shedding light on the putative redundancy of Ebf-proteins“*  
\*equal contribution
- Inga Ludenberg, Gerald Burgstaller, Hakan Sarioglu, **Bettina Groll**, Katharina Zettl, Volker Groß and Matthias Kieslinger  
*„B cell development is regulated by posttranslational modifications of Ebf1“*

Diese Dissertation wurde von 01. Juni 2008 bis 30. November 2011 am Helmholtz Zentrum München im Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik angefertigt.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den 30. November 2011

.....  
(Bettina Groll)

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.

Hiermit erkläre ich, dass ich mich anderweitig einer anderen Doktorprüfung ohne Erfolg nicht unterzogen habe.

München, den 30. November 2011

.....  
(Bettina Groll)